

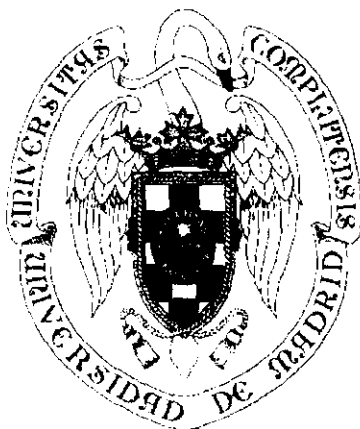
Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Ingeniería Química



X-53-34269-1



Desarrollo de Modelos Cinéticos para
Bioprocesos: Aplicación a la Producción
de Xantano

MEMORIA
que para optar al
GRADO de DOCTOR
presenta:

Almudena Alcón Martín

Madrid, 1999



A la memoria de mi padre, siempre conmigo
A mi madre

La Tesis doctoral que presenta **Dña. Almudena Alcón Martín**, titulada: **“Desarrollo de Modelos Cinéticos para Bioprocesos: Aplicación a la Producción de Xantano”**, es un completo estudio de los diferentes modelos cinéticos que pueden ser aplicados a un proceso de interés industrial, como es la producción de xantano y, en nuestra opinión, reúne los requisitos necesarios de originalidad y seriedad científica para ser definida como Tesis Doctoral. El trabajo ha sido realizado en los laboratorios de Ingeniería Química de la Facultad de C.C. Químicas, bajo nuestra dirección y ha sido subvencionado por diversas instituciones públicas.

Profesor Dr. Félix García-Ochoa Soria

Dra. Victoria E. Santos Mazorra

El presente trabajo de Investigación ha sido realizado en el Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la Dirección del Profesor Dr. D. FELIX GARCÍA-OCHOA SORIA y de la Dra. Dña. VICTORIA E. SANTOS MAZORRA, a los que quiero expresar mi agradecimiento por su enseñanza, confianza y apoyo durante todo el tiempo que me ha llevado la realización del trabajo plasmado en esta Memoria.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer la ayuda directa o indirecta en el desarrollo de esta Tesis Doctoral a una serie de personas cuya inestimable ayuda me ha hecho más fácil y gratificante mi trabajo durante estos años:

En primer lugar, mi agradecimiento especial al Prof. Felix García-Ochoa, tanto por la aportación científica como por su estímulo, y enorme paciencia. Deseo agradecerle el gran esfuerzo realizado, especialmente en la última etapa de este trabajo y por todo lo que he aprendido de él en estos últimos meses.

A Vicky, por su enseñanza y amistad, por los buenos y malos momentos.

Al Centro de Citometría de Flujo de la Facultad de Farmacia, especialmente a Alberto Alvarez, quien siempre estuvo dispuesto a echarme una mano y a darme consejo en lo que necesité.

Al Centro de Microscopía Electrónica Luis Bru, de la Universidad Complutense de Madrid, especialmente a Agustín, por su ayuda buenos consejos para observar y fotografiar a "mis bichitos".

Al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, especialmente a la Dra. Pilar Castellón y a la Dra. Carmen Acebal por poner a mi alcance la utilización del espectrofluorímetro, necesario para la realización de este trabajo.

Al Profesor D. Pedro Luis y Luis, por su categoría científica y humana, por sus buenos consejos y ánimos desde el principio de esta Tesis Doctoral.

A la Dra. Aurora Santos y al Dr. Jose Antonio Casas por estar siempre dispuestos a echarme una mano y facilitar mi trabajo.

A José Timón, siempre dispuesto a arreglar lo que dábamos por perdido y suponía perder o retrasar el trabajo.

A Inma, por su amabilidad y ayuda prestada en todo momento

Quiero agradecer el apoyo, y siempre prácticos consejos, de mi compañero Miguel Ladero, con quien he compartido durante los años de realización de esta Tesis trabajo y amistad.

A mi compañero Emilio Gómez, por su inestimable ayuda profesional y apoyo personal durante la realización de este trabajo.

A Jose Carlos y a David, con quienes he compartido estos dos últimos años de tesis, gracias por su sincera amistad y la ayuda que me han brindado. Gracias por el buen humor y las risas de cada día.

Al resto de compañeros de laboratorio Virginia, David, Alex y Pedro por su interés y aportación directa o indirecta en este trabajo.

A mis amigas "del otro lado del Atlántico", Liliana, Verónica y Miriam, con las que compartí trabajo, consejos, y sin duda, amistad.

Quiero agradecer también a mis alumnos de la Academia, especialmente a Khjadija, Besma y Monia, quienes me han dado grandes ánimos para terminar.

Por supuesto no puedo olvidarme de mis amigos con quienes he compartido momentos felices y otros no tan felices. Gracias a todos por los ánimos, por las llamadas, por las visitas y por el gran apoyo que me habéis dado, especialmente en los últimos meses. Mi más cariñoso agradecimiento a Sangee y a M^a José, y por supuesto a Eva, Samaria, Bea, Ravi, Gisella, Juan Ma, Pepe, Alberto, Raquel,...

A mi gran amigo Fernando de la Paz, por su sincera amistad y su apoyo.

A Rodrigo, por su amistad, fuerza y cariño para la redacción de la mayor parte de esta Memoria.

Quiero reservar las últimas líneas para agradecer a mi familia su cariño y grandes dosis de paciencia. A mis hermanos por su ayuda y buen humor, por estar siempre ahí cuando ha sido necesario. También a Maria, Gema, Aurora y Alberto por sus ánimos constantes y gran apoyo.

A mi madre por sus mimos, paciencia y gran impulso, para continuar, gracias por todo.

Y, por supuesto, a mi padre, que fue el que más me animó para empezar con esta Tesis, casi con más ilusión que yo. Gracias por tu sacrificio, por tu enseñanza y por tu cariño.

ÍNDICE

	<u>Página</u>
1.- <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1.- OBJETO Y ALCANCE DEL TRABAJO	10
1.2.- MODELOS CINÉTICOS	12
1.2.1.- <u>Modelos Cinéticos No Estructurados, No Segregados</u>	12
1.2.1.1.- Modelos No Estructurados del Crecimiento	13
1.2.1.2.- Modelos de Consumo de Sustratos y Formación de Productos.	18
1.2.1.3.- Influencia de las Variables en los Parámetros	19
1.2.2.- <u>Modelos Metabólicos</u>	24
1.2.3.- <u>Modelos Estructurados o de Célula</u>	30
1.2.3.1.- Modelos Compartimentados	30
1.2.3.2.- Modelos de Célula	35
1.2.4.- <u>Modelos Químicamente Estructurados</u>	38
1.2.5.- <u>Modelos Segregados</u>	39
1.2.6.- <u>Ingeniería Metabólica</u>	43
1.3.- GOMA DE XANTANO	47
1.3.1.- <u>Xanthomonas campestris</u>	56
1.3.2.- <u>Producción de Xantano</u>	59
1.3.3.- <u>Transporte de Oxígeno</u>	67
1.3.4.- <u>Aislamiento y Purificación</u>	74
1.3.5.- <u>Propiedades del Xantano</u>	78
 2.- <u>PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL</u>	 85
2.1.- EQUIPOS	85
2.2.- MATERIALES EMPLEADOS	101
2.2.1.- <u>Microorganismo</u>	101
2.2.2.- <u>Reactivos Utilizados</u>	103
2.2.3.- <u>Composición de los Medios Empleados</u>	106
2.2.4.- <u>Composición de las Disoluciones Tampón y Preparaciones para análisis</u>	107

	<u>Página</u>
2.3.- REALIZACIÓN DE UN EXPERIMENTO	108
2.4.-MEDIDA DE COMPONENTES EXTRACELULARES	110
2.4.1.- <u>Análisis de Biomasa</u>	110
2.4.2.- <u>Medida de la Concentración de Sustrato Carbonado</u>	111
2.4.3.- <u>Medida de la Concentración de Sustrato Nitrogenado</u>	113
2.4.4.- <u>Análisis de Xantano</u>	114
2.5.- ANÁLISIS DE COMPONENTES INTRACELULARES	116
2.5.1.- <u>Análisis de Componentes Intracelulares por</u> <u>Espectrofotometría de Absorción</u>	118
2.5.1.1.- Análisis de Proteínas	118
2.5.1.2.- Análisis de Ácidos Nucleicos	121
2.5.2.- <u>Técnicas de Fluorescencia</u>	125
2.6.- MÉTODOS MATEMÁTICOS	135
2.6.1.- <u>Técnicas de Estimación de Parámetros</u>	135
2.6.2.- <u>Simulación con los Modelos Cinéticos</u>	137
 3.- <u>RESULTADOS EXPERIMENTALES</u>	 141
 4.- <u>MODELO CINÉTICO NO ESTRUCTURADO</u>	 153
4.1.- FORMULACIÓN DEL MODELO	159
4.2.- AJUSTE DE LOS DATOS EXPERIMENTALES	161
4.3.- DISCUSIÓN	181
4.3.1.- <u>Estudio de la Variación del Valor de los Parámetros con las</u> <u>Variables</u>	181
4.3.1.1.- Influencia de la Temperatura	181
4.3.1.2.- Influencia de la Concentración de Amonio Inicial	189
4.3.2.- <u>Simulación con el Modelo Cinético No Estructurado</u>	191
4.3.2.1.-Influencia de la Biomasa Inicial	193
4.3.2.2.- Influencia de la Concentración de Azúcar Inicial	197
4.3.2.3.- Influencia de la Agitación	199
4.3.3.- <u>Validez del Modelo Cinético No Estructurado</u>	201

	<u>Página</u>
5.- <u>MODELO CINÉTICO METABÓLICO</u>	203
5.1.- FORMULACIÓN DEL MODELO	212
5.2.- AJUSTE DE LOS DATOS EXPERIMENTALES	216
5.3.- DISCUSIÓN	231
5.3.1.- <u>Variación del Valor de los Parámetros con las Variables</u>	231
5.3.1.1.- Influencia de la Temperatura	231
5.3.1.2.- Influencia del Amonio Inicial	237
5.3.2.- <u>Simulación con el Modelo Cinético Metabólico</u>	239
5.3.2.1.-Influencia de la Biomasa Inicial	241
5.3.2.2.- Influencia de la Concentración de Azúcar Inicial	244
5.3.2.3.- Influencia de la Agitación y el Caudal del Aire	246
5.3.3.- <u>Validez del Modelo Cinético Metabólico</u>	249
6.- <u>MODELO CINÉTICO DE CÉLULA</u>	251
6.1.- ETAPAS EN EL PLANTEAMIENTO DEL MODELO	254
6.2.- <u>MODELO CINÉTICO DEL CRECIMIENTO DE <i>Xanthomonas campestris</i></u>	261
6.2.1.- <u>Determinación de las Especies Químicas y Formulación del Esquema de Reacción</u>	261
6.2.2.- <u>Propuesta de las Ecuaciones Cinéticas</u>	281
6.2.3.- <u>Obtención de Parámetros por Ajuste en Múltiple Respuesta</u>	306
6.2.4.- <u>Discriminación de Modelos Cinéticos</u>	350
6.2.4.1.- Criterios Estadísticos	350
6.2.4.2.- Discriminación por Criterios Físicos: Variación de los Parámetros con las Variables	353
6.2.5.- <u>Mejora de las Deficiencias del Modelo Cinético de Célula</u>	366
7.- <u>MODELO CINÉTICO QUÍMICAMENTE ESTRUCTURADO</u>	377
7.1.- PLANTEAMIENTO DEL MODELO	381
7.2.- <u>APLICACIÓN DEL MODELO CON DATOS EXPERIMENTALES</u>	383
7.2.1.- <u>Mejora del Modelo Químicamente Estructurado</u>	393

7.3.- SIMULACIÓN CON EL MODELO CINÉTICO QUÍMICAMENTE ESTRUCTURADO	404
8.- <u>RESUMEN Y CONCLUSIONES</u>	411
8.1.- RESUMEN	411
8.2.- CONCLUSIONES	419
9.- <u>NOMENCLATURA</u>	431
10.- <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	437

1.- INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

Los procesos llevados a cabo con microorganismos han llegado a ser una fuente importante de numerosos productos comerciales, principalmente en la industria farmacéutica y alimentaria, pero también en otras industrias, tales como la cosmética, el análisis clínico y químico, en la biorremediación con fines ambientales, etc.

Desde que hace varias décadas se empezaron a producir antibióticos, el cambio de escala de los procesos desarrollados en laboratorio ha sido considerado un problema de gran complejidad, donde la metodología empleada en los procesos químicos puede ser aplicada. Los modelos fenomenológicos, basados en fenómenos de transporte acoplados a las reacciones químicas, pueden ser desarrollados y aplicados para el diseño del biorreactor. La dificultad que se plantea en el estudio de este tipo de sistemas se debe a su naturaleza: son sistemas trifásicos gas-líquido-sólido. La peculiaridad de estos sistemas radica en que en la fase sólida se realizan las transformaciones que llevan tanto al desarrollo del propio sólido o cultivo microbiano (crecimiento) como a la síntesis de los productos de interés. Dichas transformaciones necesitan la presencia de gran cantidad de nutrientes que se encuentran principalmente en la fase líquida, siendo de especial importancia la llegada del oxígeno, desde el aire, en sistemas aerobios.

En el cambio de escala de este tipo de procesos, la importancia relativa de los diferentes fenómenos involucrados va cambiando. Así, se deben considerar varios fenómenos que hay que estudiar de forma aislada para, una vez que el conocimiento de los mismos es suficiente, ser acoplados con vistas a la descripción del proceso global. Durante el proceso de cambio de escala lo que va variando es la velocidad relativa de los diferentes fenómenos y, quizás, la etapa controlante de la velocidad global del proceso. Debido a la complejidad de estos sistemas microbianos, el **cambio de escala** no se realiza en un solo paso desde la escala de laboratorio a la escala de producción. En el laboratorio generalmente se opera con Erlenmeyers, donde se buscan nuevos productos, mecanismos de control, medios de producción y se mejoran las cepas. Después se pasa a un biorreactor, de 1 a 2 litros de volumen, donde el contacto gas-líquido es muy distinto de la etapa anterior, después a un tamaño mayor, entre 10 y 20 litros. A esta escala, que de forma general se llama Planta Piloto, se estudian o se comprueban los efectos de diferentes variables, tales como la velocidad de agitación, el caudal de aire, la temperatura, el control del pH, etc., buscándose la simplificación de los problemas. En la primera etapa, a escala de laboratorio, también se aborda el estudio de los diferentes fenómenos y variables de forma aislada, para facilitar tanto el estudio como la comprensión. Cuando todos estos fenómenos sean suficientemente conocidos deben ser acoplados, y el conjunto debe describir el proceso global. Así, se puede proceder al diseño del biorreactor donde llevar a cabo la producción, para lo que se deben conjugar todos los factores de modo que la productividad sea la máxima alcanzable. Por tanto, es necesario realizar un cambio de escala teniendo en cuenta que el comportamiento del microorganismo, en cada nivel de producción, puede no ser el mismo; las diferencias pueden ser debidas a que las cantidades de energía y materia involucradas son distintas para producir la transformación. La complejidad de los sistemas que usan microorganismos lleva, en la práctica, a utilizar varias etapas de comprobación en el cambio de escala, y no solo una -de planta piloto- como ya es habitual en la Industria Química.

Entre los fenómenos básicos a tener en cuenta en el caso de transformaciones microbianas son destacables la **transferencia de materia entre las fases** del sistema, la descripción de la **compleja red de reacciones** que tiene lugar en el interior de las células y el posible **daño o "stress" que sufren las células** debido a las condiciones hidrodinámicas necesarias en el sistema para que el primero de los fenómenos comentados no sea la etapa limitante del proceso.

• Transferencia de materia entre fases

El mecanismo global de transporte de nutrientes a las células, su utilización y la producción y eliminación de metabolitos, se pueden dividir en una serie de etapas (Figura 1.1), cada una de las cuales ofrece una resistencia. Estas etapas se pueden resumir de la forma siguiente (Quintero, 1981; Moo-Young y Blanch, 1987):

- Transporte de nutrientes o productos desde el seno del gas hasta la interfase gas-líquido.
- Intercambio en la interfase gas-líquido.
- Transporte desde la interfase al seno de la fase líquida.
- Transporte a través de la fase líquida.
- Transporte a través de la película de líquido que rodea la célula.
- Transporte a través de la membrana o pared celular.
- Transporte en el interior de la célula, hasta el lugar donde se produce la reacción bioquímica.

Este sistema puede generalizarse a otros donde la fase continua no sea un líquido sino un gas, e incluso, en casos especiales, puede ser un sólido (fermentaciones en estado sólido, de compostaje, por ejemplo) y la fase dispersa una o más de las siguientes:

- Sólidos, tales como células, partículas con enzimas soportadas y sustratos sólidos.
- Líquidos, tales como sustancias insolubles.
- Gases, como aire, dióxido de carbono y metano.

En la mayoría de los biorreactores, la resistencia en la fase líquida supone el control global de la transferencia de materia, siendo una de las siguientes la etapa controlante del proceso (Moo-Young y Blanch, 1987):

- La combinación de la resistencia en la **película del líquido y la interfase gas-líquido**. Estas resistencias son frecuentemente la etapa controlante en la transferencia de oxígeno, debido a la baja solubilidad de este compuesto en agua.

- Resistencia en la **fase líquida** en la separación del medio acuoso continuo y la **fase dispersa**. Su importancia puede ser minimizada mediante una buena mezcla.
- Resistencia de la **fase líquida** en la proximidad de la **interfase sólido-líquido**. Esta resistencia puede ser significativa debido a la poca diferencia de densidad entre el medio acuoso continuo y la fase dispersa (microorganismos, células vegetales y animales).
- Resistencia de la **fase líquida** en la cara de la **fase sólida dispersa**. Esta resistencia puede ser significativa en procesos con células floculadas y enzimas inmovilizadas.

Como ya se ha comentado, los sistemas microbianos son heterogéneos, normalmente gas-líquido-sólido. Es por tanto imprescindible prestar atención al transporte de los nutrientes en el sistema, ya que su disponibilidad por parte del microorganismo es totalmente necesaria para el correcto desarrollo del proceso de producción. De especial importancia es el transporte gas-líquido en los sistemas aerobios, ya que el oxígeno es necesario para un gran número de reacciones.

La máxima productividad y concentración del producto alcanzable en un proceso microbiológico aerobio, en la obtención de biomasa o producto, puede estar limitada por la velocidad de transporte de oxígeno, la cual a su vez está determinada por el valor del coeficiente volumétrico de transferencia de materia, k_{LaV} . El valor de este coeficiente depende de muchas variables, como el tipo de biorreactor empleado, el sistema de aireación y mezcla y de las propiedades físicas del fluido (Yagi y Yoshida, 1975; Gómez, 1995). Dentro de las propiedades físicas, la viscosidad es una de las propiedades más significativas en los procesos de producción de polisacáridos microbianos, ya que la reología del cultivo es uno de los factores que determina la capacidad de transporte de materia y calor en los biorreactores (Pace y Righelato, 1980; Gómez, 1995). Un descenso de la concentración de oxígeno por debajo del valor crítico puede provocar un descenso acusado en la producción del metabolito (Yang y Wang, 1992; Santos 1993), la producción de otro metabolito distinto al deseado (Moes y col., 1985; Galindo y Herrera, 1989; Zhou y col., 1992) e incluso daños irreversibles en las células (Meijer, 1989; Meijer y col., 1994).

El mantenimiento de las condiciones hidrodinámicas necesarias para el correcto aporte de nutrientes a los microorganismos puede resultar perjudicial para el proceso, sometiendo a los microorganismos al denominado **stress hidrodinámico o daño celular**. Este efecto lo pueden sufrir las células cuando se someten a unas condiciones que favorecen el transporte de oxígeno –o de nutrientes en general-, pero que sus estructuras, tanto internas como externas, no son capaces de soportar, afectando a su metabolismo, y por tanto a su comportamiento general. Sin embargo, este fenómeno no ha sido todavía sistemáticamente estudiado ni descrito para poder ser incorporado en la descripción global de un sistema microbiano (Meijer, 1989; Merchuk, 1991).

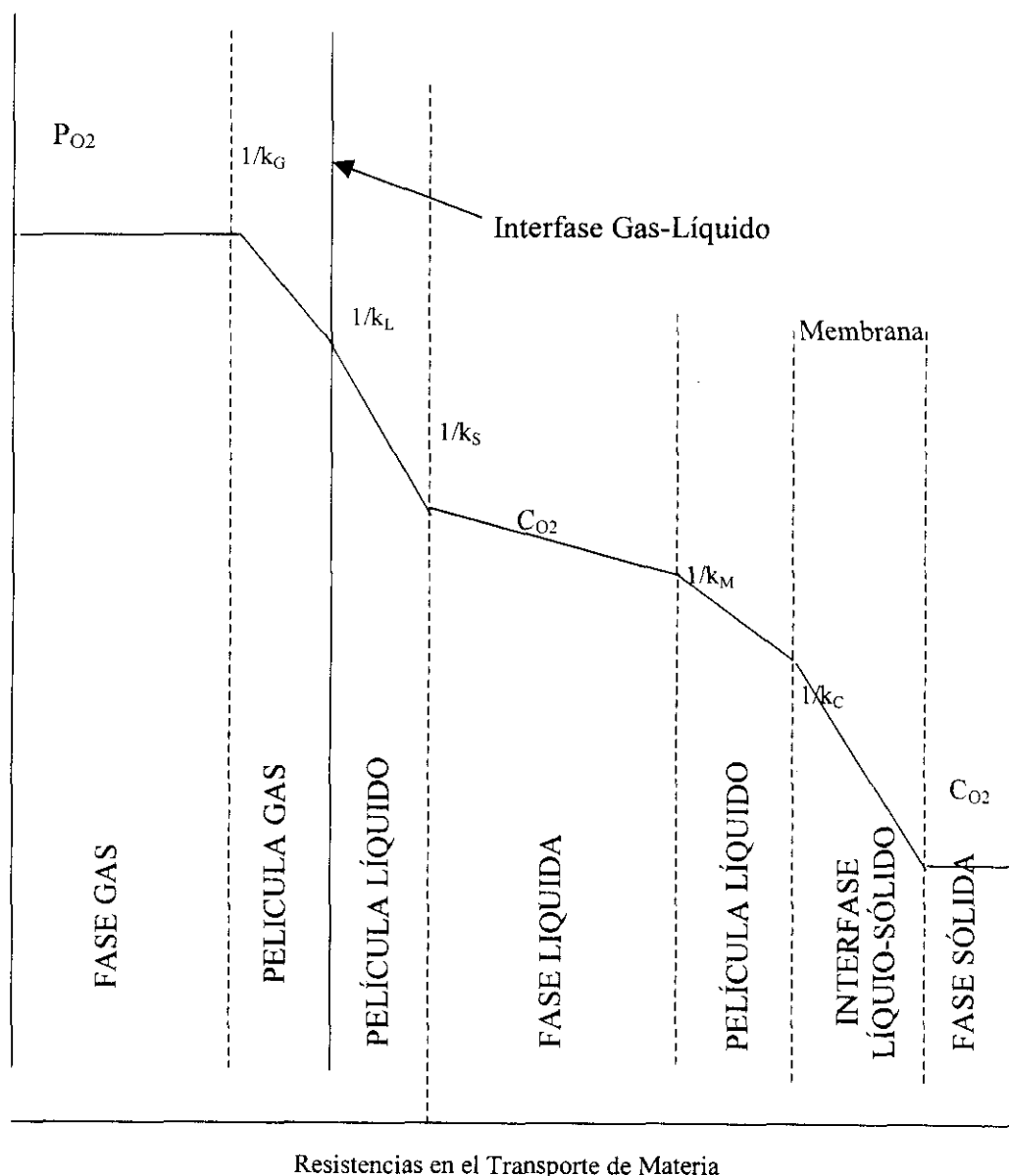


Figura 1.1.- Esquema de las resistencias en el transporte de oxígeno desde el gas hasta el microorganismo, o la fase sólida con enzima o células inmovilizadas.

• Transformación dentro del Microorganismo

Se trata siempre de una transformación compleja, es una red de reacciones enzimáticas de varios tipos, de óxido-reducción, oxidativas, de síntesis, de producción de energía, etc. El microorganismo durante su crecimiento produce numerosas macromoléculas complejas a partir de 100 unidades de monómeros. En las rutas bioquímicas, para llevar a cabo estas transformaciones, intervienen alrededor de 1000 enzimas diferentes. El metabolismo bioquímico es dividido en dos rutas generales: rutas anabólicas, para la síntesis de moléculas complejas y los precursores de los intermedios, y rutas catabólicas, que aportan la energía necesaria para los procesos anabólicos. Estas dos actividades divergentes están estrechamente ligadas, tal como se muestra en la Figura 1.2, la cual es un esquema del entramado de red de reacciones que ocurren durante una transformación microbiana. En esta figura se muestran solo las principales rutas de biosíntesis y sus principales conexiones con las rutas catabólicas, de una forma muy simplificada.

Esta enorme complejidad se podría solventar si se considerase al microorganismo como un catalizador, que por un complejo mecanismo produce un servicio o un producto. Pero este planteamiento no resulta válido, pues estas reacciones tienen un cierto carácter autocatalítico, debido al crecimiento del microorganismo, y para ello se utiliza reactantes (nutrientes), con lo que el proceso se complica notablemente, no siendo evidentes las relaciones estequiométricas, o en otras palabras, el “catalizador” interviene en la estequiometría de la(s) reacción(es).

Esto implica medir un mayor número de componentes para describir el sistema, lo que a su vez lleva implícito un número elevado de parámetros en las ecuaciones cinéticas, que hay que determinar, y que no es fácil llegar a valores por ajuste de datos experimentales. Por tanto, el abordaje del problema es enormemente complejo, como ya se ha indicado, ya que ocurren cientos de transformaciones en el interior de cada microorganismo. El metabolismo incluye sustratos -fuente de carbono y nitrógeno- y otros nutrientes (fósforo, azufre, metales, etc) y, dependiendo del caso, la producción de energía, síntesis de proteínas, ácidos nucleicos, enzimas que conllevan el crecimiento del microorganismo, etc.

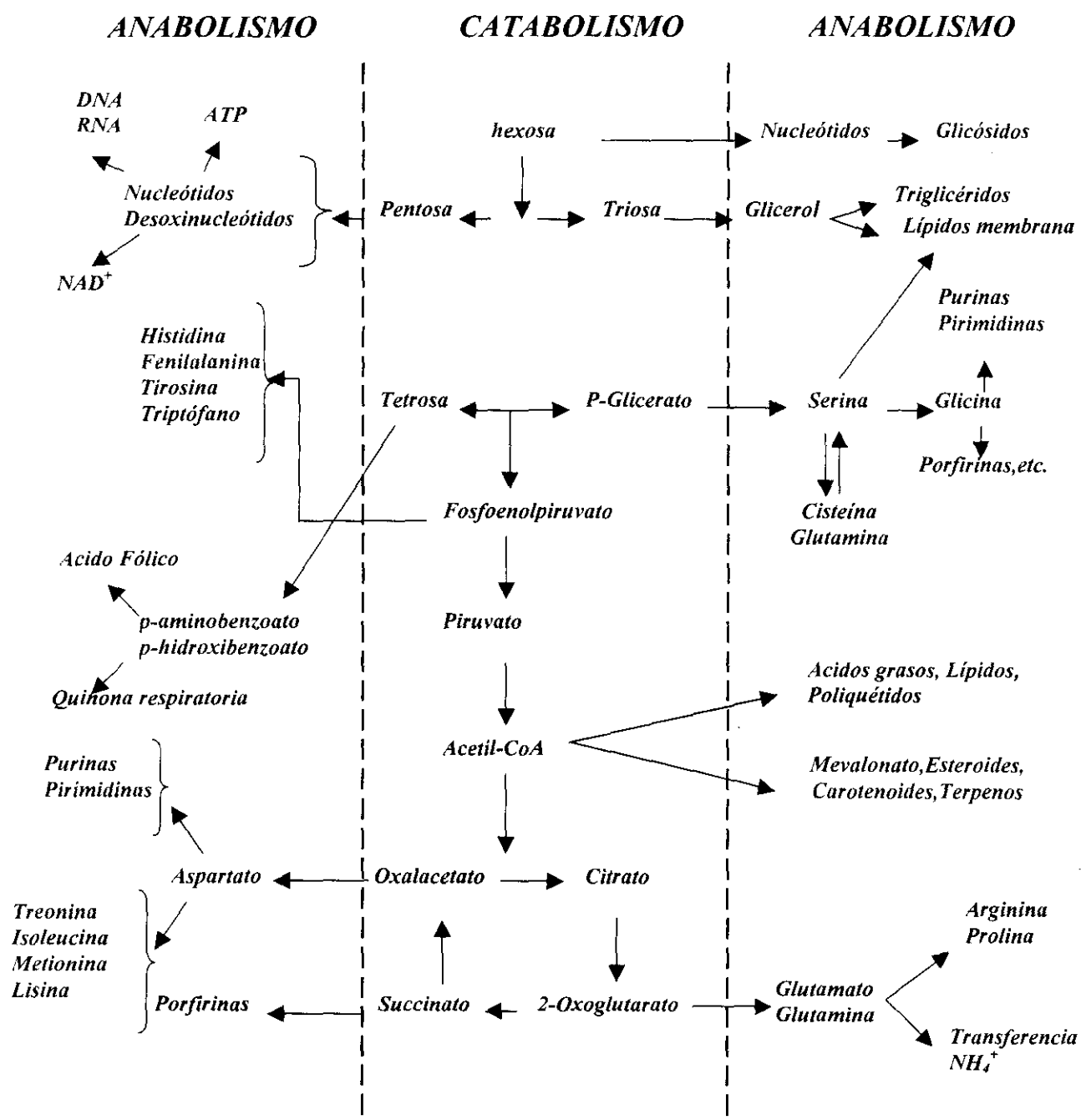


Figura 1.2.- Esquema general de las rutas anabólicas y del catabolismo central

Esta red de reacciones es complicada de describir, por un lado se cuenta con el apoyo de los métodos matemáticos para la resolución del problema de cálculo de parámetros; no obstante, con el actual desarrollo y facilidad del cálculo numérico, la principal dificultad sigue siendo la medida de un elevado número de especies químicas, cuyo análisis permitirá conocer la evolución de las concentraciones que podrán ser descritas a través de un **modelo cinético** de mayor o menor grado de dificultad.

Nielsen y Villadsen (1994) dan como definición de modelo cinético para la descripción de un proceso microbiano la siguiente: “*..la correlación verbal o matemática entre velocidades y concentración de reactantes/productos, los cuales son insertados en balances de materia y permiten la predicción del grado de conversión de sustratos y el rendimiento de productos individuales en otras condiciones de operación ...*”

La complejidad de los modelos cinéticos para describir el cambio producido dentro de la célula durante una transformación microbiana puede ser muy amplia. Se han propuesto numerosos modelos cinéticos, los cuales se pueden clasificar según se recoge en la Tabla 1.1 (García-Ochoa y col., 1999a).

Los modelos cinéticos más simples son los **modelos cinéticos no estructurados-no segregados** que consideran al microorganismo como un único componente que, de forma genérica, denominan biomasa (expresada como masa de microorganismo seco por volumen de sistema, pero esto solo por la forma habitual de realizar la medida). Los modelos denominados **metabólicos** consideran rutas metabólicas simplificadas dentro del microorganismo en las que únicamente está involucrado el sustrato carbonado. En un modelo **estructurado o de célula** se considera el metabolismo del sustrato nitrogenado, describiendo el crecimiento mediante esquemas simplificados de reacción. Cuando se unen los esquemas simplificados de reacción procedentes de modelos metabólicos y de modelos de célula se obtienen los modelos **químicamente estructurados**, en los que se describe el metabolismo microbiano global de forma simplificada, considerando al microorganismo formado por multitud de componentes internos que reaccionan entre sí. Un **modelo segregado** es aquel que considera que

una población está formada por microorganismos diferentes. En el caso de los microorganismos presentes en un cultivo puro, en el que se presentan distribuciones de alguna propiedad como edad, tamaño, etc. Se pueden denominar también como **modelos morfológicamente estructurados**. En el caso de los cultivos mixtos, la segregación puede referirse únicamente a la consideración de diferentes “biomasas” empleando para la descripción de cada una de ellas modelos no estructurados-no segregados (García-Ochoa y col., 1999b).

Los modelos más sencillos o no estructurados no-segregados son empleados para numerosas aplicaciones en la solución de problemas de ingeniería, pero para una mejor descripción del sistema es necesario utilizar modelos que tengan en cuenta esquemas de reacción complejos, es decir que tengan en cuenta las rutas del metabolismo de cada microorganismo.

Tabla 1.1.- Clasificación de Modelos Cinéticos.

Modelo Cinético	Concepto
NO ESTRUCTURADO- -NO SEGREGADO	<i>La biomasa se considera como un único componente Se considera una célula media como representativa del cultivo.</i>
METABÓLICO	<i>Normalmente no estructurado-no segregado. Se describen las rutas metabólicas como una red de reacciones empleando un esquema simplificado de reacción, con relaciones estequiométricas definidas.</i>
ESTRUCTURADO (o de CÉLULA)	<i>La descripción de la biomasa se realiza considerándola formada por varias especies. Se tienen en cuenta los componentes intracelulares.</i>
QUÍMICAMENTE ESTRUCTURADO	<i>Se considera a la biomasa formada por varias especies y también un metabolismo simplificado (una red de reacciones).</i>
SEGREGADO	<i>En la descripción del microorganismo se considera la distribución de alguna propiedad. No se considera un microorganismo medio.</i>

1.1.-OBJETO Y ALCANCE DEL TRABAJO

El presente trabajo de investigación trata de conseguir la aplicación de diferentes **modelos cinéticos** de diferente grado de complejidad a un proceso microbiano, comprobando la mejora en la descripción del sistema. Es decir, pretende realizar una **aplicación de la metodología de la Ingeniería Química** en un sistema de producción llevado a cabo por un microorganismo, el cual sintetiza un producto de interés industrial.

El sistema a modelizar es la **producción de xantano**, un sistema bien conocido. Este proceso ya ha sido estudiado y desarrollado en un trabajo previo (Santos, 1993) y se tiene el conocimiento suficiente de las variables que influyen en el proceso de producción, concretamente la temperatura, la composición del medio y la velocidad de transporte de oxígeno juegan un papel relevante en el proceso de producción.

Los modelos cinéticos que se plantearán tratan de conseguir la descripción de la influencia de ciertas variables en dicho proceso de producción, considerando posteriormente todos los diferentes fenómenos involucrados, de forma que el conjunto sirva como modelo predictivo de la evolución del sistema y su respuesta a perturbaciones en el medio, variables de operación, etc.

Los modelos que se van a proponer a lo largo de esta Tesis Doctoral son de diferente grado de complejidad. El primer paso es comenzar por un modelo sencillo, de los conocidos como **no estructurados**, pues desde un punto de vista técnico tiene sentido iniciar un estudio de este tipo con los modelos cinéticos más sencillos. Además, el abordaje, tanto *experimental* como *matemático*, es relativamente asequible, lo que hace que el primer planteamiento al comenzar a modelizar un sistema sea con modelos de este tipo. Se determinará si este modelo es suficiente para la descripción del sistema, para lo cual se estudiará la influencia de dos variables sobre la evolución de los parámetros del modelo (temperatura y concentración de nitrógeno inicial). En caso de que no exista una relación de parámetros con las variables a estudiar, se modificará el modelo planteado de modo que sea capaz de tener en cuenta la evolución de los parámetros con la variable, y así poder obtener una relación en función de la variable estudiada. En caso de no ser suficiente este modelo se irá complicando hasta llegar a **modelos estructurados**, que, si bien más complejos, se acercan más a la realidad, es decir tienen más sentido fisiológico.

La progresiva complicación en el planteamiento de modelos para la descripción del sistema microbiano debe llevar consigo una mejora en la consideración de algún aspecto en la propia descripción del sistema, es decir, debe de ser capaz de subsanar deficiencias encontradas en los modelos más simples desarrollados y aplicados a los datos experimentales en las primeras etapas del presente trabajo.

En definitiva, el objetivo final de esta Tesis Doctoral es llegar a aplicar un modelo cinético de los denominados químicamente estructurados, pues probablemente sean los únicos capaces de tener en cuenta los cambios en la composición del medio, especialmente en lo referente al sustrato nitrogenado, tan ligado al crecimiento del microorganismo. Para llevar a cabo la aplicación de este tipo de modelos será preciso un conocimiento profundo, tanto bioquímico y microbiológico, de la bacteria *Xanthomonas campestris*. Además, se hace necesario realizar un estudio exhaustivo y puesta a punto de métodos rápidos y fiables para el **análisis de compuestos intracelulares** de forma cuantitativa. Para ello, se van a comparar diferentes tipos de técnicas de análisis de estos componentes, desde las técnicas bioquímicas convencionales, pasando por técnicas espectrofluorimétricas, hasta llegar a una técnica cada vez más utilizada en microbiología como es la **citometría de flujo**.

Finalmente será necesario desarrollar una metodología para hacer frente a la difícil tarea de proponer y aplicar modelos cinéticos estructurados. Hay que tener en cuenta que apenas hay antecedentes en la literatura en cuanto a la propuesta de este tipo de modelos, y no se encuentra ajuste de datos experimentales, y el consiguiente cálculo del valor de los parámetros, ni, desde luego, la relación de los valores de los parámetros en diferentes experimentos realizados en condiciones diversas.

1.2.- MODELOS CINÉTICOS

A continuación se realiza una breve revisión sobre los diferentes tipos de modelos cinéticos planteados en la literatura de acuerdo a la clasificación comentada en la Tabla 1.1.

1.2.1.- Modelos Cinéticos No Estructurados- No Segregados

Los modelos más sencillos del crecimiento -modelos no estructurados- están expresados en términos de unidades abstractas de vida, generalmente se emplea el término población microbiana o “biomasa”, ignorando completamente la estructura interna de las células que componen dicha biomasa, ya que consideran a la población como una unidad homogéneamente distribuida. Aunque los modelos no estructurados son una gran simplificación del problema real, suelen ser útiles para ser empleados con fines tecnológicos, ya que proporcionan ecuaciones sencillas con sentido físico, en las que se trata al microorganismo como una especie reactante sencilla. El esquema más complicado al que podría responder este tipo de modelos es el que se representa en la Figura 1.3, donde aparece el consumo de sustratos por las células, tanto para crecer como para producir, así como los conceptos de respiración endógena y energía de mantenimiento, que serán comentados más adelante.

Los modelos no estructurados recogidos en la literatura incorporan parte del esquema representado en la Figura 1.3. Para poder realizar una revisión de este tipo de modelos se han dividido en dos grupos: modelos de crecimiento y modelos de consumo de sustratos y formación de productos.

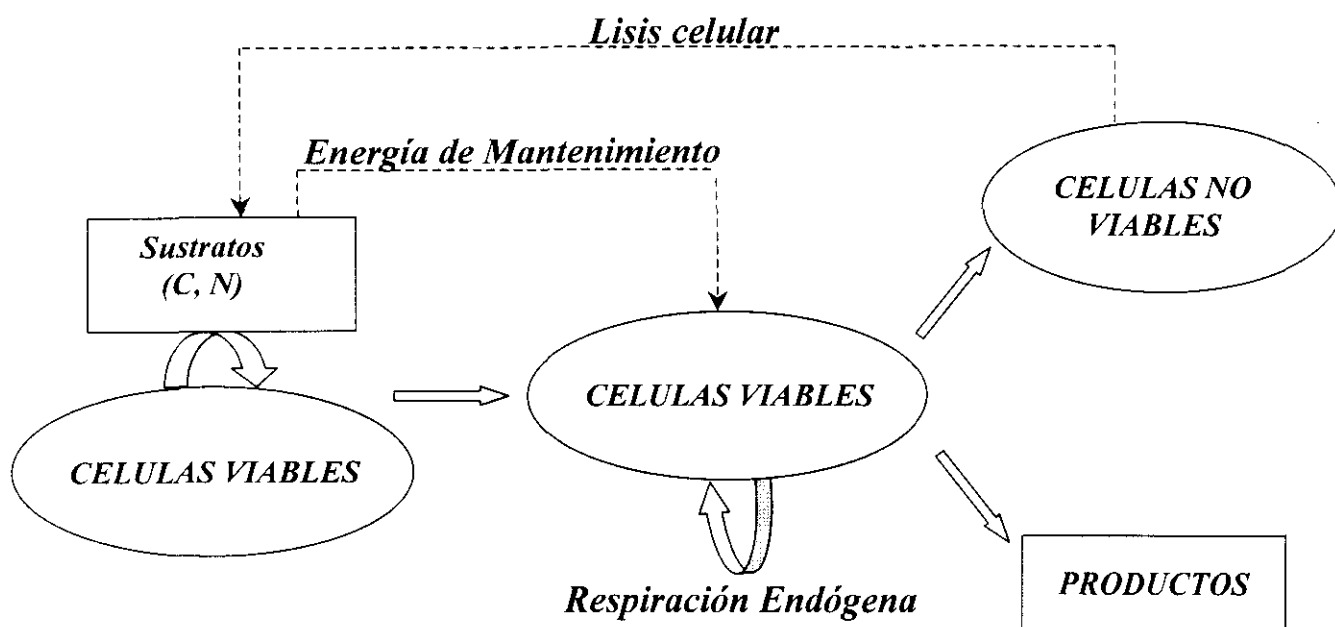


Figura 1.3.- Esquema de reacción simplificado de los Modelos No Estructurados

1.2.1.1.- Modelos No Estructurados de Crecimiento

Dentro de este tipo se encuentran modelos que relacionan el crecimiento del microorganismo únicamente con la propia concentración de biomasa y otros que hacen depender el crecimiento de la concentración de un sustrato, que suelen denominar “sustrato limitante”.

En el primer grupo de esta clasificación se encuentra la **Ley de Malthus**, que está planteada para describir el crecimiento “balanceado”, es decir, las actividades de síntesis celular están coordinadas de manera que la composición celular media no se ve afectada por la proliferación de la población. Por ello, es capaz de representar la fase exponencial de crecimiento en fermentaciones en discontinuo o “batch” y las fermentaciones en continuo, ya que al mantenerse el valor de las variables en estado estacionario, se obtiene un valor constante de la velocidad de crecimiento (μ), lo que se aproxima mucho a lo que se considera un crecimiento balanceado.

La Ley de Malthus se emplea de forma amplia en estudios microbiológicos sobre el crecimiento, debido a la gran simplicidad del modelo, pues solo es necesario conocer la evolución experimental de la biomasa con el tiempo. La citada expresión de Malthus viene dada por la siguiente ecuación:

$$\frac{dC_X}{dt} = \mu \cdot C_X \quad [1.1]$$

Este modelo es incapaz de predecir la concentración de biomasa en la fase estacionaria, ya que su tendencia es al crecimiento infinito. Esto es debido a que, en realidad, la velocidad específica de crecimiento no es constante durante todo el proceso del crecimiento en discontinuo y, por tanto, no es capaz de predecir todas las fases del ciclo de crecimiento. En consecuencia, cuando se plantea la representación de un sistema microbiano en discontinuo, teniendo en cuenta no solo su crecimiento, sino también el consumo de sustratos y la formación de productos, la ecuación [1.1] no se puede emplear dentro del conjunto de ecuaciones necesarias, ya que llevaría al absurdo del crecimiento infinito. Sin embargo, puede proporcionar resultados aceptables en sistemas en continuo, aunque nunca con sentido físico.

La segunda expresión empleada para representar el crecimiento, y que es únicamente dependiente de la concentración de biomasa, es la conocida como **ecuación logística**, que resulta de la integración de la siguiente ecuación:

$$\frac{dC_X}{dt} = \mu \cdot C_X \cdot \left(1 - \frac{C_X}{C_{X_m}} \right) \quad [1.2]$$

La ecuación [1.2] presenta, para una concentración inicial de biomasa determinada, dos parámetros: μ y C_{X_m} . La ecuación logística es capaz de proporcionar una curva con las tres fases de crecimiento del microorganismo: latencia, exponencial y estacionaria. Esta ecuación fue propuesta de forma empírica, como modelo para el estudio del crecimiento de microorganismos, debido a que la forma de la función matemática era similar a la observada para el crecimiento de microorganismos en discontinuo, posteriormente fue deducida de forma mecanística (Santos, 1993).

Las expresiones que hacen depender el crecimiento de microorganismos, tanto de la concentración de biomasa como del “sustrato limitante”, hacen que esta dependencia de la concentración del citado sustrato esté incluida dentro de la velocidad específica de crecimiento (μ), siendo la ecuación general:

$$\frac{dC_X}{dt} = \mu(C_S) \cdot C_X \quad [1.3]$$

La primera expresión de este tipo fue la propuesta por **Blackman** (1905):

$$\begin{aligned} \mu(C_S) &= \mu_m \quad \because C_S > \mu_m \cdot B \\ \mu(C_S) &= \frac{C_S}{B} \quad \because C_S \leq \mu_m \cdot B \end{aligned} \quad [1.4]$$

donde B es una constante. Este modelo plantea que hasta que la concentración de sustrato no haya llegado a cierto valor no influye en el crecimiento y se puede aplicar la ley de Malthus.

Posteriormente, **M'Kendrick y Pai** (1910) eliminaron la primera parte de la expresión de Blackman (1905), planteando para todo el intervalo de concentración de sustrato la siguiente expresión:

$$\frac{dC_X}{dt} = \mu \cdot C_S \cdot C_X \quad [1.5]$$

proponiendo, por primera vez, una relación estequiométrica entre la velocidad de consumo del sustrato y la de producción de biomasa:

$$\frac{dC_S}{dt} = -\frac{1}{Y_{XS}} \cdot \frac{dC_X}{dt} \quad [1.6]$$

A partir de estas expresiones (ecuaciones [1.5] y [1.6]), se deduce la ecuación logística:

$$C_X = \frac{C_{X_0} \cdot \exp(\mu \cdot t)}{1 - \frac{C_{X_0}}{C_{X_m}} \{1 - \exp[\mu \cdot t]\}} \quad [1.7]$$

siendo:

$$\mu = \frac{\mu_m \cdot C_{X_m}}{Y_{XS}} = \mu_m \cdot \left(\frac{C_{X_0}}{Y_{XS}} + C_{S_0} \right) \quad [1.8]$$

$$C_{X_m} = C_{X_0} + Y_{XS} \cdot C_{S_0} \quad [1.9]$$

Otra ecuación que relaciona la velocidad específica de crecimiento con la concentración de un sustrato limitante es la propuesta por **Tiesser** (1942):

$$\frac{dC_X}{dt} = \mu_m \cdot \left[1 - \exp\left(-\frac{C_S}{K}\right) \right] \cdot C_X \quad [1.10]$$

Posteriormente, **Monod** (1949 y 1950) propuso otra expresión del tipo de la ecuación [1.3], de forma empírica, y similar a la ecuación ya propuesta por Michaelis-Menten para las reacciones enzimáticas. El planteamiento se basaba en que, en realidad, las reacciones que tienen lugar en el interior del microorganismo son enzimáticas:

$$\frac{dC_X}{dt} = \frac{\mu_m \cdot C_S}{K_S + C_S} \cdot C_X \quad [1.11]$$

El modelo propuesto por Monod está formado por las ecuaciones [1.7] y [1.11]. Este modelo se simplifica en las siguientes condiciones particulares:

$$K_S \ll C_S \therefore \frac{dC_X}{dt} = \mu_m \cdot C_X \quad [1.12]$$

$$K_S \gg C_S \therefore \frac{dC_X}{dt} = \frac{\mu_m}{K_S} \cdot C_X \cdot C_S \quad [1.13]$$

La simplificación que lleva a la ecuación [1.12] corresponde a la Ley de Malthus, mientras que cuando K_S es mucho mayor que la concentración de sustrato, la ecuación [1.13] se simplifica a la expresión propuesta por M'Kendrick y Pai (1910). Estas mismas condiciones particulares se corresponden con el modelo propuesto por Blackman (1905) (ecuación [1.4]).

A partir de los diferentes modelos comentados hasta el momento, se observa que la expresión fundamental de la cinética microbiana es el modelo propuesto por Monod (1949 y 1950) (ecuaciones [1.7] y [1.11]), ya que excepto la propuesta por Tiesser (1942) -que no parece tener explicación mecanística- el resto de las expresiones comentadas pueden entenderse como simplificaciones del citado modelo, según la concentración de “nutriente limitante” presente en el medio; ya que la concentración del citado nutriente varía durante la fermentación, el modelo propuesto por Monod se puede simplificar a unas u otras expresiones durante el transcurso de la misma. Este hecho es corroborado de forma patente en el trabajo de Esener y col. (1982) sobre modelos no estructurados, en el que se ajustan los mismos datos experimentales con diferentes modelos, no siendo capaces de discriminar entre ellos.

Un concepto importante, que fue tenido en cuenta posteriormente en los modelos cinéticos no estructurados, es la **respiración endógena**, introducido por **Herbert** (1958), que plantea que parte de la propia masa celular se emplea en mantener las células en estado viable, dándose este proceso a velocidad constante, independientemente del valor de la velocidad específica del crecimiento:

$$\frac{dC_x}{dt} = (\mu(C_s) - \mu_e) \cdot C_x \quad [1.14]$$

Esto conlleva un descenso en la cantidad de biomasa, una vez agotado el nutriente o sustrato que aporta energía.

También se han propuesto expresiones para el crecimiento bajo la suposición de que el microorganismo se ve inhibido por la presencia de alguna sustancia -que puede ser sustrato o producto- en cierta cantidad. Las expresiones más comunes son:

- **Inhibición por sustrato**, fue propuesto por Wayman y Tseng (1976); estos autores consideran que existe una concentración crítica de sustrato, por debajo de la cual no se produce inhibición del crecimiento.
- **Inhibición por producto**, propuesto por Hinshelwood (1946) plantea que la inhibición del crecimiento, por parte del producto, depende de la concentración del mismo.

1.2.1.2.- Modelos de Consumo de Sustratos y Formación de Productos

La primera relación propuesta para el consumo de sustratos es la comentada anteriormente, que relaciona la velocidad de crecimiento de la población con la de consumo del sustrato mediante un “rendimiento macroscópico” (Y_{XS}), representado en la ecuación [1.4].

Posteriormente, **Pirt** (1965) observó que el citado rendimiento macroscópico no presentaba valores constantes a lo largo de la transformación, por lo que consideró que el sustrato se emplea para funciones asociadas y no asociadas al crecimiento, proponiendo la siguiente relación:

$$\frac{1}{Y_{XS}} = \frac{1}{Y_{XS}^{max}} + \frac{m_s}{\mu} \quad [1.15]$$

Introdujo así el **coeficiente de mantenimiento** (m_s), el cual trata de explicar el consumo de sustrato para el mantenimiento de la biomasa en estado viable. Esto es normalmente aplicable sólo al sustrato empleado como fuente energética (generalmente azúcares). Sustituyendo la expresión [1.15] en la [1.7], se obtiene la siguiente ecuación:

$$\frac{dC_s}{dt} = - \left(\frac{1}{Y_{XS}^{max}} \cdot \frac{dC_x}{dt} + \frac{m_s}{\mu} \cdot \frac{dC_x}{dt} \right) \quad [1.16]$$

Esta expresión proporciona el consumo de sustrato, cuando se emplea tanto para el crecimiento como para el mantenimiento celular del microorganismo.

Cuando el sustrato energético se emplea también para la producción, se define un nuevo “rendimiento macroscópico” de sustrato en producto (Y_{PS}^{max}), incorporándose el término de consumo del sustrato para la producción en la ecuación [1.16], de la siguiente forma:

$$\frac{dC_s}{dt} = - \left(\frac{1}{Y_{XS}^{max}} \cdot \frac{dC_x}{dt} + \frac{1}{Y_{PS}^{max}} \cdot \frac{dC_p}{dt} + \frac{m_s}{\mu} \cdot C_x \right) \quad [1.17]$$

En cualquier caso, se hace necesario disponer de una expresión de la evolución del producto con el tiempo que se pudiera sustituir en la ecuación anterior. El planteamiento de las ecuaciones de la velocidad de formación de productos depende del tipo de producto de que se trate. Así, según Röels y Kossen (1978), basándose en la terminología propuesta por Gaden (1959), clasifica los productos en las siguientes categorías:

- Productos no asociados al crecimiento
- Productos asociados al crecimiento
- Productos parcialmente asociados al crecimiento

La velocidad de producción del producto en cuestión puede expresarse de acuerdo a la ecuación denominada de **Luedeking-Piret** (1959):

$$\frac{dC_P}{dt} = m \cdot C_X + n \cdot \frac{dC_X}{dt} \quad [1.18]$$

El primer término de esta expresión representa la producción no asociada al crecimiento y el segundo la producción asociada al crecimiento, por lo que para los primeros tipos de productos, se debe emplear únicamente uno de los términos de esta ecuación.

1.2.1.3.- Influencia de las Variables en los Parámetros

Las variables más estudiadas que influyen en la velocidad de cambio de los sistemas microbianos son: temperatura, pH y, en sistemas aerobios, la concentración de oxígeno disuelto.

Debido a la existencia de una temperatura óptima de crecimiento, la variable más estudiada en este tipo de sistemas ha sido la temperatura (Esener y col., 1983; Ratkowsky y col., 1983; Bailey y Ollis, 1986); en particular, su influencia en la velocidad específica máxima de crecimiento. Así, Esener y col. (1983) y Bailey y Ollis (1986) expresan la citada variación de la siguiente forma:

$$\mu_m(T) = \frac{k_{01} \cdot \exp\left(-\frac{\Delta H_1}{RT}\right)}{1 + k_{02} \cdot \exp\left(-\frac{\Delta H_2}{RT}\right)} \quad [1.19]$$

mientras que Sinclair (1987) y Shu y Yang (1991) plantean:

$$\mu_m(T) = k_{01} \cdot \exp\left(-\frac{E_1}{RT}\right) - k_{02} \cdot \exp\left(-\frac{E_2}{RT}\right) \quad [1.20]$$

y, por último Ratkowsky y col. (1983) emplean la expresión:

$$\mu_m(T) = \{ C_1 \cdot (T - T_{min}) \cdot [1 - \exp(C_2 \cdot (T - T_{max}))] \}^2 \quad [1.21]$$

La influencia de la temperatura en el resto de parámetros ha sido menos estudiada; Esener y col. (1983) plantean la variación del rendimiento macroscópico del sustrato carbonado en biomasa (Y_{XS}) y del coeficiente de mantenimiento (m_s), mientras Shu y Yang (1991) lo hacen para los parámetros de la ecuación de Luedeking-Piret (m y n). Apenas hay datos en la literatura sobre estos aspectos.

La influencia del pH en los parámetros cinéticos de este tipo de modelos, apenas ha sido estudiada, únicamente Sinclair (1987) propone una expresión de su influencia en la velocidad específica máxima de crecimiento, como la siguiente:

$$\mu_m(pH) = \frac{\mu_m}{1 + \left(\frac{C_1}{[H^+]} + C_2 \cdot [H^+] \right)} \quad [1.22]$$

El máximo proporcionado por esta función estará más o menos desplazado en la escala de pH dependiendo del tipo de microorganismo de que se trate (basófilo, acidófilo o neutrófilo).

En los procesos aerobios, se le está dando gran importancia al estudio de la evolución de oxígeno disuelto en el sistema (Cho y Wang, 1990; Hoojimans y col., 1991). En un proceso fermentativo, la evolución de oxígeno disuelto responde a la siguiente ecuación (Moo-Young y Blanch, 1987):

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = k_L a_V \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) - q_{O_2} \cdot C_X \quad [1.23]$$

El segundo sumando del segundo miembro indica la velocidad total de consumo de oxígeno debida al microorganismo, que se corresponde con la suma del oxígeno necesario para mantenimiento celular y para el crecimiento (Pinches y Pallent, 1986; Cho y Wang, 1990):

$$q_{O_2} \cdot C_X = m_{O_2} \cdot C_X + \frac{1}{Y_{O_2X}^{max}} \cdot \frac{dC_X}{dt} \quad [1.24]$$

sustituyendo la ecuación [1.3] en la [1.24], se obtiene:

$$q_{O_2} = m_{O_2} + \frac{\mu}{Y_{O_2X}^{max}} \quad [1.25]$$

que en ocasiones puede ser reducida a (Cho y Wang, 1990):

$$q_{O_2} = \frac{\mu}{Y_{O_2X}^{max}} \quad [1.26]$$

En el caso de que sea el oxígeno el nutriente limitante del crecimiento, se pueden emplear las ecuaciones cinéticas tipo Monod, tanto para la velocidad específica de crecimiento, como para el consumo de oxígeno (Cho y Wang, 1990), de acuerdo, respectivamente, a las siguientes expresiones:

$$\mu = \frac{\mu_m \cdot C_{O_2}}{K_{O_2} + C_{O_2}} \cdot C_X \quad [1.27]$$

$$q_{O_2} = \frac{q_{O_2}^{max} \cdot C_{O_2}}{K_{O_2} + C_{O_2}} \cdot C_X \quad [1.28]$$

Para poder plantear un modelo cinético no estructurado, donde se tenga en cuenta no sólo el crecimiento, sino también el consumo de sustratos y la formación de productos, es imprescindible tener datos experimentales en los que se analicen los sustratos, productos y biomasa a lo largo del tiempo. En definitiva, se trata de observar si los sustratos influyen en el crecimiento y en la producción para incluir o no los términos correspondientes en las

velocidades de producción de cada uno de los compuestos que intervienen. En el caso de que la expresión de velocidad de producción del sustrato limitante del crecimiento se vea afectada por la producción, se tendrán que repasar las suposiciones realizadas para el planteamiento de la expresión para describir el crecimiento. Esto es particularmente importante en el caso de adoptar la ecuación logística, ya que esta ecuación parte de la suposición de que el crecimiento y el consumo del sustrato limitante están relacionados únicamente por un "rendimiento macroscópico" o coeficiente estequiométrico constante a lo largo de la transformación.

En definitiva, para el planteamiento de un **modelo cinético no estructurado** no segregado, que sea capaz de describir el crecimiento, el consumo de los sustratos y la producción, se deben de obtener datos experimentales a partir de los cuales se pueda saber, en principio, qué términos se deben incluir en las expresiones de las velocidades de producción de los diferentes compuestos. Es decir, hay que plantear el esquema de reacción simplificado entre los compuestos comentados, a partir de los datos obtenidos. De otra forma, siempre se pueden ajustar los datos experimentales con diferentes expresiones que tomen en cuenta distintas posibilidades, y elegir el mejor ajuste, es decir, un ajuste razonable con el menor número de parámetros posible. Sería entonces aplicable, en ambos casos, la metodología establecida para la discriminación entre modelos cinéticos de reacciones múltiples (Kittrell, 1970; Froment, 1975; García-Ochoa y Romero, 1993).

Los modelos descritos hasta ahora, esto es, **los modelos no estructurados** serán buenos cuando los microorganismos posean una composición celular que esté aproximadamente en estado estacionario. No obstante, cuando tienen lugar cambios en la composición celular, los modelos no estructurados proporcionan, en la mayoría de los casos, una pobre aproximación a la realidad. Es también lógico pensar que los modelos no estructurados no sean capaces de reflejar la influencia de ciertas variables, fundamentalmente la composición del medio. Para estos casos se han propuesto un tipo de modelos que tienen en cuenta cambios en la estructura interna del microorganismo y, en casos muy complejos, únicamente modelos de este tipo serán capaces de explicar la evolución del cultivo.

Este tipo de modelos, más complejos, se corresponden con la clasificación que fue mostrada en la Tabla 1.1 y pueden resumirse de la siguiente forma:

- **Modelos metabólicos**, son modelos que podrían englobarse dentro de los no estructurados, pero emplean un esquema simplificado de reacción para describir las rutas metabólicas de consumo de sustrato y formación de productos como una red de reacciones. Describen el crecimiento como en los modelos no estructurados.
- **Modelos de célula**, describen la biomasa considerándola formada por varias especies, teniendo en cuenta los componentes intracelulares y proponiendo para su descripción un esquema de reacción simplificado.
- **Modelos químicamente estructurados**, se pueden considerar como la suma de los dos tipos de modelos anteriores.
- **Modelos segregados**, en la descripción del microorganismo se considera la distribución de alguna propiedad. Estos modelos no consideran un microorganismo medio, como en los casos anteriores.

El problema de plantear este tipo de modelos es relativamente parecido al abordado en estudios de ciertos sistemas químicos reaccionantes extraordinariamente complejos, aunque menos que la mayoría de las transformaciones biológicas, es decir, del uso de microorganismos para obtener productos de interés. Así como para la descripción de procesos químicos complejos, tales como el craqueo de hidrocarburos o la oxidación de hidrocarburos se ha desarrollado y aplicado una metodología que ha cubierto distintas etapas, o al menos ha considerado distintas posibilidades; el camino y posibilidades tomados en cuenta han sido, conceptualmente, bastante parecidos a lo hecho, en las tres últimas décadas, en el análisis de sistemas microbianos. Por ejemplo, en el craqueo y oxidación de hidrocarburos, primero se describió el sistema como si se tratara de una reacción simple, añadiendo una distribución de productos, en función de ciertas variables, normalmente condiciones de operación (García-Ochoa y col., 1990a); se intentó también describir el sistema con toda su complejidad, analizando cientos de reacciones con decenas de especies químicas, incorporando los valores de los coeficientes cinéticos calculados de forma individual por otros autores, o suponiendo valores similares a los calculados para reacciones o etapas parecidas (Sundaram y Froment, 1978; Milhail y col., 1983; Navarro, 1986). Estos dos extremos tienen su correspondencia en el estudio de las transformaciones microbianas, en la simple reproducción de la biomasa con el tiempo, de acuerdo a ecuaciones simples, sin

justificación mecanística (ecuación de Malthus, por ejemplo), y en la reciente propuesta de **modelos de célula** con cientos de reacciones y decenas de especies químicas participando en el esquema (simplificado) del metabolismo celular (Jeong y col., 1990). El camino adecuado parece ser intermedio, con la utilización de esquemas de reacción simplificados, pero realistas, utilizando *lumping* o una asociación de especies químicas para simplificarlo, y una metodología para la discriminación entre modelos posibles pasando por el cálculo de parámetros (Sundaram y Froment, 1977; García-Ochoa y col., 1990b). En los sistemas biológicos, esta metodología se corresponde con la propuesta de modelos estructurados en **Compartimentos**, capaces de describir las transformaciones de forma simplificada, pero mucho más cercana a la realidad que los modelos sencillos, siempre que su grado de complejidad no sea exagerado. Según Shuler (1985), en su revisión sobre modelos cinéticos estructurados, para que un modelo cumpla esa situación de compromiso “... *debe presentar un mínimo de parámetros ajustables, la mayoría de los parámetros deben ser determinados a partir de experimentos independientes o estimados por una serie objetiva de reglas. Debe ser tratable matemáticamente y debe tener alta fidelidad en los procesos biológicos, teniendo que ser posible la verificación experimental del modelo*”.

1.2.2.- Modelos Metabólicos

Este tipo de modelos plantea estructura sólo para el metabolismo del o de los sustratos carbonados, sin diferenciar partes en la biomasa, ya que la siguen considerando como en los modelos no estructurados; es por ello que se pueden considerar como modelos no estructurados-no segregados. Dentro de este tipo, existen modelos muy diferentes, muchas veces propuestos para problemas muy específicos de forma teórica (Van Dedem y Moo-Young, 1973; Geraats y col., 1990; Bibila y Flickinger, 1991), realizando una simulación a partir de unos parámetros estimados de una manera que no siempre queda clara.

Otros autores plantean estudios metabólicos más generales, como es el caso de Koga y col. (1969) y de Barford y col. (Barford, 1990; Hall y Barford, 1981; Barford y Hall, 1981; Barford y col. 1992a y 1992b; Montes y col., 1998), aunque en todos los casos se plantea para el caso específico de la levadura fermentativa *Saccharomyces cerevisiae*.

Los modelos metabólicos planteados en la literatura, están todos realizados con la levadura *Saccharomyces cerevisie*. Estos modelos responden, de forma general, al esquema planteado en la Figura 1.4, donde el sustrato carbonado es introducido en la célula mediante un sistema de transporte. La célula puede utilizar este sustrato como “esqueleto” para sintetizar nuevas células (crecimiento), o bien transformar este sustrato carbonado en un intermediario reducido (IR), el cual puede ser fermentado a etanol o bien ser introducido en la mitocondria para, a través del ciclo TCA y la respiración obtener energía en forma de ATP.

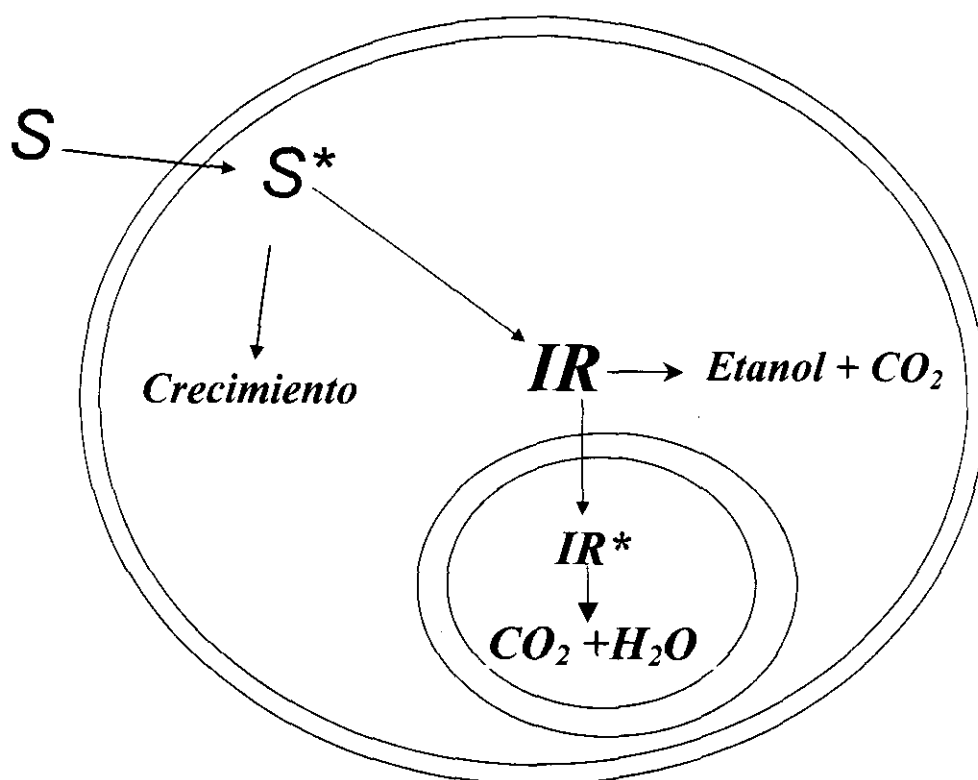
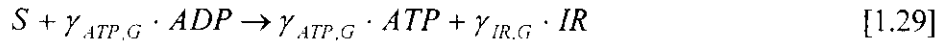


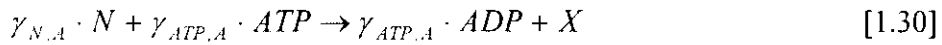
Figura 1.4.- Esquema general de los modelos metabólicos para la levadura *Sacchoromyces cerevisie*, existentes en la literatura.

El modelo de **Koga y col. (1969)** plantea seis reacciones dentro del metabolismo de la levadura *Saccharomyces cerevisi*, y que responderían al esquema planteado en la Figura 1.4.:

- Glicolisis (r_G):



- Metabolismo anabólico (r_A):



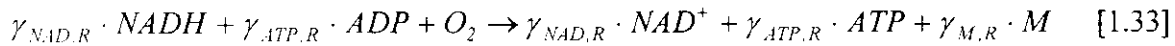
- Metabolismo catabólico (r_C):



-Ciclo TCA (r_T):



- Respiración (r_R):



- Fermentación (r_F):



Los autores proponen ecuaciones cinéticas globales –tipo Monod- para cada una de dichas reacciones:

- Glicolisis:

$$r_1 = r_{Gmax} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S} \cdot \frac{C_{ATP}}{K_{ATP} + C_{ATP}} \cdot C_{ADP} \cdot C_X \quad [1.35]$$

- Metabolismo anabólico:

$$r_2 = r_{Amax} \cdot \frac{C_N}{K_N + C_N} \cdot C_{ATP} \cdot C_X \quad [1.36]$$

- Metabolismo catabólico:

$$r_3 = k_C \cdot C_{ATP} \cdot C_X \quad [1.37]$$

- Ciclo TCA:

$$r_4 = r_{T_{max}} \cdot \frac{C_{NAD}}{K_{NAD} + C_{NAD}} \cdot \frac{C_{Py}}{K_{Py} + C_{Py}} \cdot C_X \quad [1.38]$$

- Respiración:

$$r_5 = r_{R_{max}} \cdot \frac{C_O}{K_O + C_O} \cdot C_{NADH} \cdot C_X \quad [1.39]$$

- Fermentación:

$$r_6 = k_F \cdot C_{Py} \cdot C_X \quad [1.40]$$

El conjunto de las velocidades de producción se puede escribir en función de una matriz de coeficientes estequiométricos (γ_{ij}), como en el tratamiento cinético clásico de reacciones múltiples (García-Ochoa y Romero, 1993):

$$\frac{dC_i}{dt} = \sum_{j=1}^6 \gamma_{ij} \cdot r_j \quad ; j = 1,11 \quad [1.41]$$

Koga y col. (1969), no estiman los parámetros del modelo por ajuste de datos experimentales sino que toman estos parámetros de la bibliografía, realizando de esta forma simulaciones con el modelo.

El equipo de **Barford** propone un modelo algo sencillo. Comienza su planteamiento en 1981 (Barford y Hall, 1981) y se completa en 1990 (Barford, 1990), siendo ampliado al caso de múltiples sustratos en 1992 (Barford y col., 1992a y 1992b).

El esquema de reacción que plantean viene dado por el siguiente grupo de ecuaciones:

- Para el transporte del sustrato carbonado a través de la membrana plasmática, (r_1):



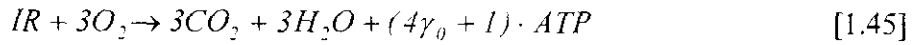
- Transformación del sustrato en el IR (r_2):



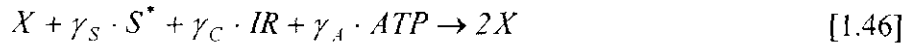
- Formación de etanol por fermentación de IR (r_3):



- Ciclo de TCA (r_4):



- Para el crecimiento (r_5):



Las ecuaciones cinéticas que proponen estos autores también son tipo Monod:

$$r_1 = k_1 \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S} \cdot C_X \quad [1.47]$$

$$r_3 = k_3 \cdot \frac{C_{IR}}{K_{Py} + C_{IR}} \cdot C_X \quad [1.48]$$

$$r_4 = k_4 \cdot \frac{C_{IR}}{K_{IR} + C_{IR}} \cdot C_X \quad [1.49]$$

$$r_5 = k_5 \cdot \left(\frac{C_{ATP}}{C_X} \right) \cdot C_X \quad [1.50]$$

La velocidad r_2 , la obtienen a partir de la suposición de estado pseudoestacionario para S^* :

$$\frac{dC_{S^*}}{dt} = 0 = r_1 - r_2 - v_S \cdot r_3 \therefore r_2 = r_1 - v_S \cdot r_3 \quad [1.51]$$

Por lo tanto el modelo final viene dado por el siguiente grupo de ecuaciones diferenciales (velocidades de producción):

- Sustrato carbonado:

$$\frac{dC_S}{dt} = -r_1 \quad [1.52]$$

- Biomasa:

$$\frac{dC_X}{dt} = r_5 \quad [1.53]$$

- Intermediario reducido:

$$\frac{dC_{IB}}{dt} = \gamma_P \cdot r_2 - r_3 - r_4 - \gamma_C \cdot r_5 \quad [1.54]$$

- Oxígeno disuelto:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = -3r_4 \quad [1.55]$$

- Para el ATP:

$$\frac{dC_{ATP}}{dt} = (4\gamma_0 + 1) \cdot r_4 + \gamma_P \cdot r_2 - \gamma_A \cdot r_5 \quad [1.56]$$

Como puede observarse el planteamiento del modelo es muy similar al de Koga y col. (1969), pero este modelo es más sencillo pues el número de componentes clave se ha reducido a cinco, en lugar de tener once como en el caso anterior.

Los parámetros del modelo de Barford se estiman, en todos los casos, a partir de datos en bibliografía o tomando en consideración datos experimentales, pero por métodos particulares, no por regresión.

Un modelo metabólico más reciente, también realizado sobre *Saccharomyces cerevisiae* es el propuesto por **Montes y col. (1998)**, basado en el modelo de Bardford, el cual, a su vez, está basado en el concepto de que el metabolismo aerobio de las levaduras es determinado mediante el transporte de azúcar al interior celular y la velocidad de transporte de piruvato dentro de la mitocondria. Los parámetros de este modelo son obtenidos de forma experimental, por ajuste de datos con el modelo propuesto.

De los modelos metabólicos planteados en la literatura se puede concluir que este tipo de modelos son abordables tanto desde el punto de vista matemático como desde el punto de vista experimental, pues, como se ha visto, el número de parámetros que presentan no es elevado y los productos o componentes clave que son necesarios analizar no suelen precisar de métodos de análisis complicados.

1.2.3.- Modelos Estructurados o de Célula

Como se ha comentado previamente, este tipo de modelos se caracteriza por que la descripción de la denominada biomasa se realiza de forma estructurada, es decir, se considera que está formada por componentes que reaccionan entre sí. Los modelos encontrados en la literatura clasificables dentro de este tipo se pueden dividir a su vez en dos:

- **Modelos Compartimentados**, en los que la consideración de los componentes internos de la biomasa no se realiza de forma explícita. Se divide la biomasa en subunidades o compartimentos a las que se le asigna una función, pero que no representan a compuestos intracelulares específicos.
- **Modelos de Célula**: estos modelos proponen esquemas simplificados de reacción en los que los compuestos intracelulares aparecen explícitamente.

1.2.3.1.- Modelos Compartimentados

Los modelos **compartimentados** agrupan detalles del metabolismo microbiano en grupos, estando el metabolismo total tratado en términos de un número de componentes- bloques o compartimentos- más o menos limitados que, a veces, tienen una definición bioquímica aproximada. Estos modelos suelen presentar pocos parámetros (entre 5 y 15). Es un concepto parecido al *lumping* empleado en reacciones múltiples (García-Ochoa y col., 1990b).

El modelo compartimentado más sencillo es el formado por dos bloques; este tipo de modelos se comenzó a desarrollar a mediados de los 60 y se siguen empleando en la actualidad. Dentro de este tipo de modelos de dos compartimentos se encuadran los debidos a : Dean y Hinshelwood (1966); Williams (1967); Ramkrishna y col. (1967); Verhoff y col. (1972); Bijkerk y Hall (1977); Esener y col. (1982); Bleecken (1984); Nielsen y col. (1991a y 1991b) y Nikolajsen y col. (1991). Todos estos modelos, excepto el primero, identifican los compartimentos con partes de la biomasa (DNA, proteínas, etc.), denominando a las partes en que dividen a la biomasa de diferentes formas, como por ejemplo: componente sintético, genético o estructural.

El modelo planteado por **Ramkrishna y col.** (1967), divide el citoplasma en dos componentes estructurales, cuya interacción entre sí y con el ambiente que les rodea, produce el crecimiento. Denominan masa G al grupo formado por ácidos nucleicos (DNA y RNA) y masa D a las proteínas; proponiendo el esquema simplificado formado por cuatro reacciones en el que la formación de un inhibidor del crecimiento puede dar lugar a formas muertas de las masas G y D (N_G y N_D).



El citado modelo proporciona curvas de crecimiento con todas las fases observadas experimentalmente, incluyendo la fase de latencia. La concentración total de protoplasma viable es la suma de las concentraciones de los dos compartimentos. El modelo predice fenómenos observados en el crecimiento en discontinuo, ya que las curvas obtenidas dependen de las siguientes variables (Tsuchiya y col., 1966):

- i) La proporción relativa entre G y D en el inóculo, lo que influye en la longitud de la fase de latencia.
- ii) El tamaño del inóculo, cuyo aumento proporciona una disminución de la fase de latencia.

Como planteamiento teórico, parece coherente, el problema está en determinar la sustancia inhibidora del crecimiento y en analizar la cantidad de la misma presente en las células; para poder obtener los parámetros del modelo por regresión de datos experimentales.

De los modelos de dos compartimentos citados, el que ha tenido mayor repercusión posterior ha sido el **modelo de Williams** (1967). En este modelo se distinguen dos compartimentos: la sección sintética (K) y la sección genético-estructural (G). Se supone que las células se dividen tan pronto como el compartimento G se ha doblado en tamaño. Williams sugirió que el compartimento G está formado por DNA y proteínas, y el K por RNA y moléculas pequeñas. El esquema de reacción planteado es el siguiente:



Con las siguientes ecuaciones cinéticas:

$$r_1 = k_1 \cdot C_S \cdot (C_K + C_G) \quad [1.62]$$

$$r_2 = k_{21} \cdot C_S \cdot C_K \cdot C_G \quad [1.63]$$

Sin embargo, **Röels y Kossen** (1978) modifican el modelo incluyendo diferentes cambios:

a) Se dan dos tipos de reacciones:

- i) Reacciones gobernadas por las concentraciones por unidad de biomasa (fase biótica).
- ii) Reacciones en las que son de importancia las concentraciones referidas a unidad de cultivo (fase abiótica).

b) Incluyen coeficientes estequiométricos en el esquema de reacción.

c) Proponen ecuaciones cinéticas potenciales, del tipo:

$$r_n = k_n \cdot \prod_{i=1}^m C_i \cdot \prod_{j=m+1}^n C_j \cdot C_X \quad [1.64]$$

donde i está referido al cultivo y el índice j a la biomasa. Por lo tanto, al aumentar la velocidad r_n aumenta la biomasa en la misma proporción.

Estos autores calculan los parámetros del modelo por regresión no lineal y reproducen datos experimentales.

Las últimas modificaciones del modelo de Williams (1967) son las realizadas por **Nielsen y col.** (1991a y 1991b); **Nikolajsen y col.** (1991). En estos modelos se incluyen los dos compartimentos, aunque cambia la nomenclatura empleada, denominan compartimento A o parte activa de la célula (proteínas y RNA) y compartimento G o parte inactiva (DNA e hidratos de carbono). El modelo desarrollado por el equipo de Villadsen (Nielsen y col., 1990a y 1991b; Nikolajsen y col., 1991) incluye dos tipos de sustratos (carbonado y nitrogenado) y la formación de productos, suponiendo que el sustrato nitrogenado sólo

interviene en la formación de biomasa, mientras que el sustrato carbonado se emplea tanto para el crecimiento como para la producción. El esquema general se da en la Figura 1.5. Este modelo debido a que incluye la formación de dos productos, podría ser clasificado dentro de los modelos Químicamente Estructurados, en el que el metabolismo se considera de forma compartimentada.

Estos autores (Nielsen y col., 1991a y 1991b) calculan los valores de los parámetros a partir de los experimentos realizados, pero no por regresión, y comprueban la reproducción de datos experimentales (Nielsen y col., 1991) donde aumentan el número de sustratos carbonados a tres reproduciendo posteriormente a datos experimentales.

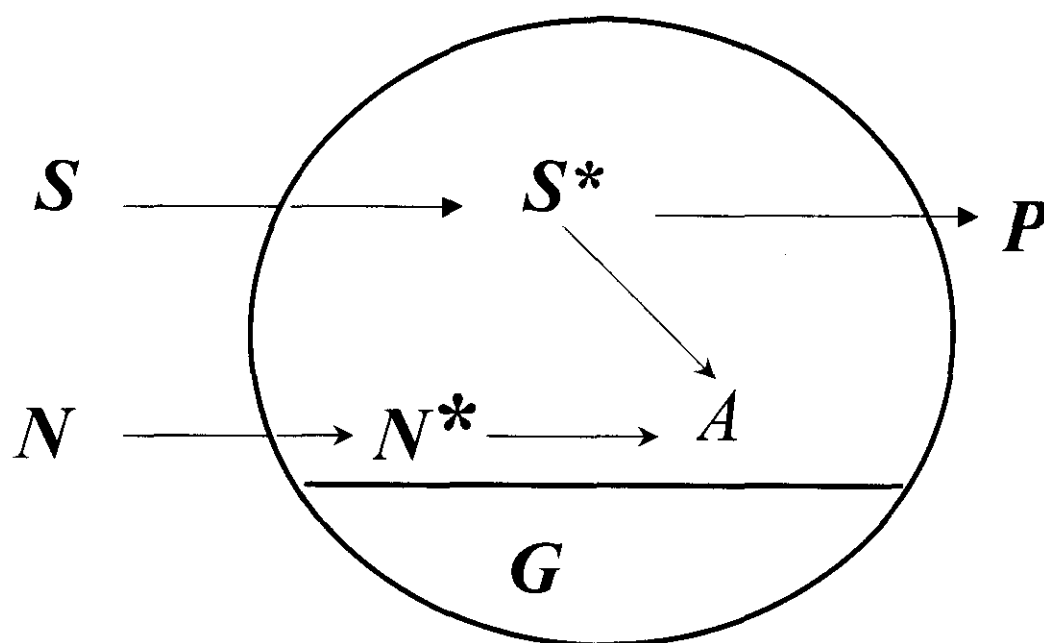


Figura 1.5.- Esquema general del Modelo de Nielsen y col. (1991a y 1991b).

Dentro de los modelos compartimentados hay modelos con más de dos compartimentos, como el propuesto por **Harder y Röels** (1982), que está formado por tres compartimentos según el esquema de la Figura 1.6. El compartimento K representa el RNA, el compartimento G las proteínas y el compartimento R la biomasa restante, principalmente hidratos de carbono y precursores, tales como ácidos nucleicos y aminoácidos. Se supone que los tres compartimentos se sintetizan a partir de un sustrato interno y hay sólo una fuente de carbono que se emplea tanto para la síntesis de ATP como para precursores. Se supone que el sustrato limitante entra en la población celular y se incorpora directamente al compartimento R; los compartimentos K y G se forman a partir de precursores que hay en R; K y G se pueden degradar dando lugar de nuevo a precursores, que retornan al compartimento R; esto último se puede identificar con el mantenimiento. Las expresiones cinéticas sugeridas por Harder y Röels (1982) están basadas en la suposición del estado pseudoestacionario para el ATP y los precursores. La justificación de esta hipótesis es que los tiempos de relajación para la adaptación del ATP y los precursores son mucho menores que para los otros componentes (R, G y K). Shuler (1985) criticó la aplicación que hicieron los autores del modelo a un lodo activado, partiendo de parámetros obtenidos para *E.coli*, sin tener en cuenta las posibles interacciones entre las diferentes especies presentes.

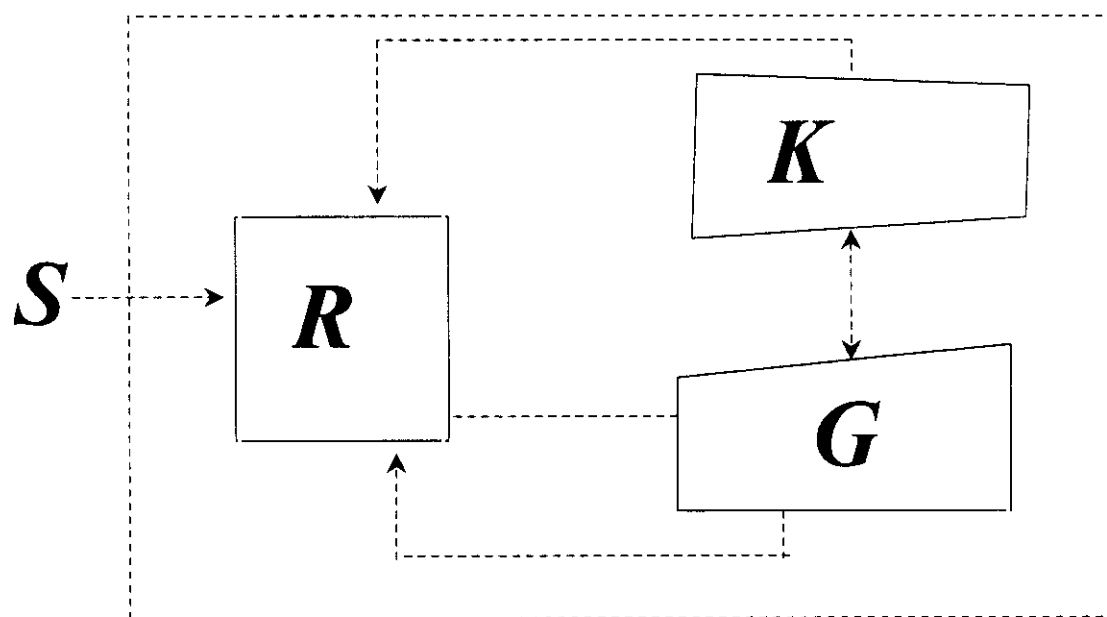


Figura 1.6.- Esquema del modelo de Harder y Röels (1982).

1.2.3.2- Modelos de Célula

Como ya se ha comentado anteriormente, la principal característica de este tipo de modelos es que considera la biomasa formada por componentes intracelulares, identificando a estos compuestos no como un compartimento, como sucede en los modelos compartimentados, sino teniendo en cuenta al compuesto en sí en un entramado de reacciones que puede ser más o menos complejo. Para desarrollar un modelo de célula se debe tener un conocimiento detallado del microorganismo, por lo que los modelos encontrados en la literatura están desarrollados para microorganismos muy conocidos, como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* o *Sacharomyces cerevisiae*. Este tipo de modelos se caracteriza por un elevado número de parámetros (entre 74 y 200) que los autores generalmente estiman a partir de datos que existen en bibliografía. Estos modelos están desarrollados únicamente de forma teórica y explican sólo el crecimiento del microorganismo.

Dentro de estos modelos complejos de crecimiento, se incluye el trabajo pionero del grupo de Shuler, en el que se desarrolla el modelo de Cornell para *E. coli*. Un esquema del modelo inicial (Shuler, 1985) se representa en la Figura 1.7. En este modelo se considera a la célula como un reactor que es libre para cambiar de forma y volumen y responder a cambios en las concentraciones de glucosa y amonio, que se incorporan a la célula para dar lugar a las reacciones en su interior. Se emplea *lumping* en el planteamiento del esquema de reacción —es decir, se agrupan, por ejemplo las proteínas citoplasmáticas y de pared en un solo compuesto, se agrupan todos los aminoácidos en otro, se agrupan ribonucleótidos y deoxirribonucleótidos, etc-, en total, consideran 18 componentes, para los que plantean sus velocidades de producción, con expresiones cinéticas generalmente tipo Monod. El modelo presenta 88 parámetros que estiman de forma independiente realizando experimentos específicos, en los que parece aislarse ciertas partes del modelo para obtener los valores deseados. El modelo lo plantean como una buena herramienta para testar cuantitativamente los mecanismos de control celular.

El modelo de Cornell, propuesto por el grupo de Shuler, fue evolucionando con el tiempo, siendo considerados diferentes aspectos: en 1984 (Domach y col., 1984), se aplicó a

poblaciones; en 1985, fue ampliado (Shuler, 1985) para incluir situaciones de anaerobiosis, alterando los mecanismos de generación de energía en la célula; en 1986 fue modificado por Peretti y Bailey (1986) examinando las interacciones huesped-plásmido.

Otro ejemplo de este tipo de modelos es el propuesto por **Jeong y col. (1990)**. Estos autores desarrollan un modelo muy complejo para la descripción del crecimiento y la esporulación de *Bacillus subtilis*. El esquema de reacción considerado se recoge en la Figura 1.8. Este modelo tiene en cuenta 35 componentes intracelulares, en los que se incluyen intermedios metabólicos de la glicolisis, gluconeogénesis, ciclo TCA, y una representación detallada del metabolismo de los nucleótidos. En total está formado por 39 ecuaciones diferenciales que contienen 200 parámetros.

El modelo se emplea para simular el crecimiento en un bioreactor tanque operando en discontinuo, empleando valores de los parámetros obtenidos de bibliografía, con los que los autores obtienen una buena reproducción de los datos que observan experimentalmente. Simulan la evolución de los 35 componentes, pero no analizan los citados componentes, de hecho, en el trabajo publicado, no aparecen datos experimentales.

En ninguno de los modelos de célula encontrados en la literatura se obtienen los valores de los parámetros del modelo mediante ajuste de datos experimentales, debido a que el análisis de muchos de esos componentes no se realiza, dada la complejidad de dichos análisis. Por lo tanto, y como se ha indicado anteriormente, estos modelos tan complicados no parecen los más adecuados, al menos desde el punto de vista técnico (Esener y col., 1983). De hecho, para la simulación de una transformación microbiana, y la elección y diseño del reactor más conveniente, no es necesario ir al nivel de complejidad que exigen estos modelos. Sin embargo, puede que en el futuro haya que emplearlos, ya que, en la actualidad, los modelos cinéticos más sencillos, ajustados a datos experimentales conseguidos en diferentes experimentos, proporcionan unos parámetros, en general, no relacionables. Es decir, no se consiguen ecuaciones cinéticas con los parámetros en función de las variables de operación (temperatura, pH, composición del medio empleado, velocidad de transporte de oxígeno, etc.) que sean capaces de predecir los resultados en experimentos llevados a cabo en variedad de las citadas condiciones de operación. Esto debe ser el gran logro de los modelos cinéticos estructurados,

frente a la simplicidad de los modelos no estructurados. En cualquier caso, aunque los modelos de célula sean necesarios, es de suponer que serán modelos más sencillos que los propuestos hasta ahora, con menos componentes clave, y, por tanto, con necesidad de medir menos compuestos, de tal forma que el cálculo de parámetros por regresión sea abordable. Esto implica hablar de modelos con no más de 7 a 10 componentes clave, el mismo número de etapas en el esquema de reacción, y no más de 20 parámetros.

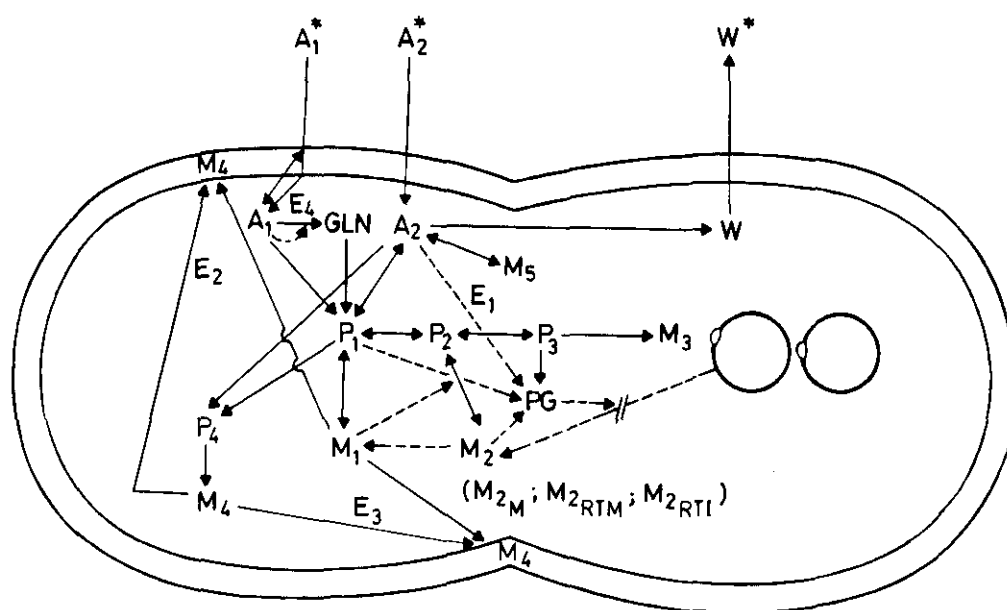


Figura 1.7- Esquema del modelo de Domach y col. (1984), siendo:

- A_1 = amonio
- A_2 = glucosa (componentes asociados en la célula)
- W = productos residuales (CO_2 , H_2O)
- P_1 = aminoácidos
- P_2 = ribonucleótidos
- P_3 = desoxiribonucleótidos
- P_4 = precursores envuelta celular
- M_1 = proteína (citoplasmática y de envuelta celular)
- M_{2RTI} = RNA inmaduro estable
- M_{2RTM} = RNA maduro estable
- M_{2M} = RNA mensajero
- M_3 = DNA
- M_4 = porción no proteica de la envoltura celular
- M_5 = glicogeno
- P_G = ppGpp
- E_2, E_3 = moléculas implicadas directamente en la formación de la pared celular
- GLN = glutamina
- E_1 = glutamina sintetasa
- *- material presente en el medio externo

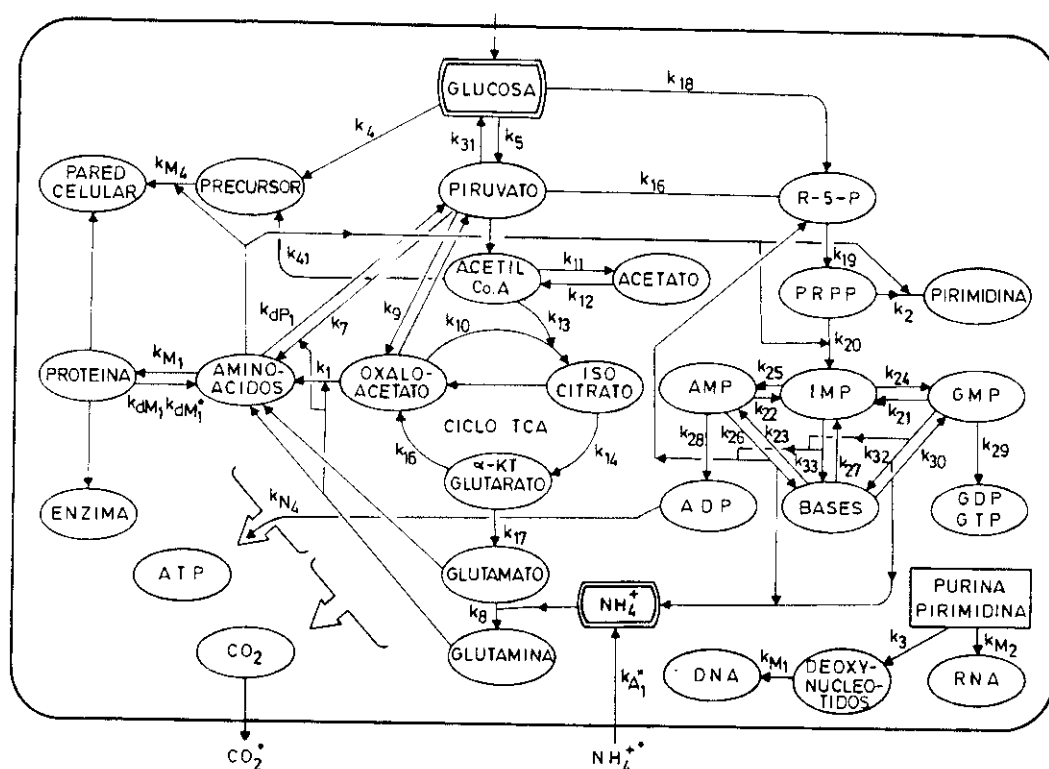


Figura 1.8.- Esquema del modelo de Jeong y col. (1990).

1.2.4.- Modelos Químicamente Estructurados

Ya se ha comentado que este tipo de modelos considera la biomasa formada por varias especies, de la misma forma que en los modelos de célula pero, además, los modelos químicamente estructurados describen el metabolismo como una red de reacciones empleando esquemas simplificados de reacción, como en los modelos metabólicos ya descritos. En definitiva, un **modelo químicamente estructurado** se formula por la unión de un modelo metabólico -en el que se describe la producción del producto de interés teniendo en cuenta el sustrato carbonado dentro de la red simplificada de rutas metabólicas-, junto con el modelo de célula -que describe el crecimiento del microorganismo productor-.

Los modelos más complejos empleados hasta ahora han sido los modelos de célula con los cuales era posible realizar una buena descripción del crecimiento teniendo en cuenta la

evolución de componentes intracelulares durante el mismo. Estos modelos eran realizados sobre sistemas de sobra conocidos como *E.coli* o *Bacillus subtilis* y no con microorganismos empleados con un interés industrial. En consecuencia no es posible observar la aplicación de tales modelos desde este punto de vista, ni poder predecir el comportamiento del microorganismo cuando se realiza un cambio de escala.

Por esta razón, es necesaria la propuesta de los modelos químicamente estructurados, es decir, los que tienen en cuenta los principios del modelo de célula pero además del modelo metabólico con lo que, en principio será posible modelizar una producción de interés industrial, permitiendo realizar simulaciones en el cambio de escala del proceso. Además podría permitir la relación de parámetros del modelo en función de las variables del proceso, como temperatura, oxígeno disuelto, composición del medio, etc.

Aunque teóricamente estos modelos presentan grandes ventajas respecto a los comentados anteriormente, no existe en la literatura ningún modelo de este tipo. La modelización más compleja vista hasta ahora se ha quedado en el nivel de modelos de célula, donde se realiza un estimación de parámetros sin ajuste de datos experimentales y sin aplicación en un sistema de producción de interés industrial.

1.2.5.- Modelos Segregados

El desarrollo de modelos segregados se comenzó en la década de los años 60, planteándose modelos de escasa aplicación práctica (Tsuchiya y col., 1966; Matsumura y col., 1973; Kobasyashi, 1966), debido a que estos primeros modelos segregados pertenecen a la clase de modelos de balance de población, que se basa en la definición de una función de distribución de propiedad que expresa la probabilidad de que la citada propiedad presente cierto valor y, en el caso de los modelos desarrollados en la década comentada, la propiedad elegida era la edad celular, siendo difícil de medir e incluso de definir la edad celular en un cultivo microbiano: es difícil enlazar el concepto de edad con la teoría bioquímica existente y no es satisfactorio suponer que lo que tiene influencia en el proceso sea la edad en sí misma en lugar de los cambios en la composición.

En la literatura inicial sobre modelos segregados se encuentra un grupo de modelos que usa el tamaño o masa celular como propiedad a considerar en la función de distribución (Eakman y col., 1966). Este tipo de modelos basados en el tamaño o la masa celular han sido los precursores de los modelos segregados que se desarrollan y emplean en la actualidad en la descripción de sistemas microbianos, en los que el microorganismo es de tipo filamentoso (hongos, principalmente). Los hongos filamentosos forman parte de un subgrupo de hongos muy importante a nivel industrial, ya que se emplean en la síntesis de metabolitos, tanto primarios como secundarios.

El metabolismo primario de los hongos filamentosos es muy similar al de las levaduras. El mecanismo de crecimiento de los hongos filamentosos es, sin embargo, completamente diferente del de los microorganismos unicelulares. Los modelos descritos hasta este punto son válidos únicamente para microorganismos unicelulares, ya que en ellos se combina el modelo celular con un modelo de población no segregado que considera a todas las células idénticas. En el caso de microorganismos filamentosos, el modelo que describa la evolución del sistema debe tener en cuenta los cambios morfológicos que allí se producen, es decir, debe ser un modelo segregado. Este tipo de modelos es denominado por algunos autores como modelos morfológicamente estructurados (Nielsen y Villadsen, 1992; Nielsen, 1993).

Los modelos para microorganismos filamentosos se pueden de nuevo dividir en dos grandes grupos:

- Modelos de crecimiento
- Modelos de crecimiento y producción

Modelos de crecimiento de hongos filamentosos

Las células de los hongos filamentosos están unidas en estructuras denominadas hifas, estos elementos hifales crecen sólo en las células situadas en los extremos de las hifas, denominadas puntas o yemas, produciéndose nuevas yemas en células intermedias de la hifa por un mecanismo denominado ramificación.

El crecimiento de las yemas o puntas se produce generalmente a cierta velocidad de extensión constante, que está condicionada por la composición intracelular y el entorno que la rodea; por lo tanto, el crecimiento exponencial de un cultivo de hongos filamentosos se deberá sólo a la existencia de una frecuencia de ramificación de la hifa. Así, mientras que el crecimiento de un microorganismo unicelular se caracteriza por una velocidad específica de crecimiento, para caracterizar el crecimiento de hongos filamentosos se necesitan tanto la frecuencia de ramificación como la velocidad de extensión de la yema (Nielsen y Villadsen, 1992). Sin embargo, estas variables son difíciles de evaluar y, debido a la falta de mejores medidas, la velocidad específica de crecimiento se emplea también para caracterizar el crecimiento de hongos filamentosos.

Nielsen y col. (Nielsen, 1992; Nielsen y Villadsen, 1992; Nielsen 1993) refieren el índice de crecimiento de la hifa que se emplea generalmente es la unidad de crecimiento hifal, a la masa de la hifa (m_{hgu}):

$$l_{hgu} = \frac{l_h}{n_y} \quad [1.56]$$

$$V_{hgu} = \frac{V_h}{n_y} \quad [1.57]$$

$$m_{hgu} = \frac{M_h}{n_y} \quad [1.58]$$

Nielsen (1993) plantea la relación entre ellos:

$$m_{hgu} = \rho (1 - \omega) V_{hgu} = \rho (1 - \omega) \frac{\pi}{4} d^2 l_{hgu} \quad [1.59]$$

Este autor (Nielsen, 1992) comprobó que la unidad de crecimiento hifal referida a la masa de la hifa es aproximadamente constante en diferentes condiciones y para diferentes especies de hongos filamentosos; sin embargo, el diámetro de la hifa varía, lo que implica que la unidad de crecimiento hifal referida a la longitud de la hifa también será variable.

Según Nielsen y Villadsen (1992), si la citada unidad de crecimiento hifal (ecuación [1.65]) es constante, tanto la velocidad de extensión de las yemas como la frecuencia de ramificación son proporcionales a la velocidad específica de crecimiento de la biomasa, y para ambas variables la constante de proporcionalidad es la unidad de crecimiento hifal.

Según el valor de esta constante se obtiene un tipo u otro de estructura macroscópica:

- Si m_{hgu} presenta un valor elevado: hifas largas con pocos puntos de ramificación.
- Si m_{hgu} presenta un valor bajo: densa estructura hifal con muchos puntos de ramificación.

Estas estructuras se denominan "*pellets*".

Esta estructura macroscópica presenta gran importancia, ya que en el caso de un tamaño de *pellet* elevado se pueden presentar problemas respecto a la difusión del sustrato hasta la zona interna de la hifa.

Los modelos empleados en la literatura para describir el crecimiento de hongos filamentosos son generalmente modelos no estructurados, ya que siguen expresando la cantidad de microorganismo presente en el cultivo en términos de biomasa (Yang y col., 1992; Nielsen, 1993; Viniegra-González y col., 1993; Patankar y col., 1993), empleando, generalmente, expresiones como la ecuación logística o la ecuación de Monod, para su descripción.

Entre los modelos propuestos para el crecimiento de microorganismos filamentosos existe uno especialmente curioso, el propuesto por Aynsley y col. (1990) en el que se identifica a la hifa con un reactor tubular autoextensible para simular su crecimiento.

Modelos de crecimiento y producción en hongos filamentosos

Nielsen y Villadsen (1992) incluyen en su revisión tres modelos sobre hongos filamentosos (Matsumura y col., 1981) también segregados, ya que consideran reacciones de metamorfosis o diferentes formas morfológicas, pero con la particularidad de ser estructurados de tipo metabólico, ya que, debido a que prestan especial atención a la producción (de

antibióticos, enzimas, etc.) desarrollan ligeramente el metabolismo del sustrato en el interior del hongo. En el modelo de Matsumura y col. (1981), se consideran tres tipos de reacciones: toma de sustratos, reacciones de metamorfosis y reacciones de los sustratos en el interior del microorganismo, enfocadas a la producción. Los citados autores plantean ecuaciones cinéticas para los dos últimos tipos de reacciones, siendo, generalmente, expresiones tipo Monod o potenciales.

1.2.6.- La Ingeniería Metabólica

Diversos autores (Esener y col., 1983; Nielsen y Nikolajsen, 1992; García-Ochoa y Romero, 1993) coinciden en la idea de que los modelos cinéticos para transformaciones microbianas, que van a desarrollarse y aplicarse en la(s) próxima(s) década(s), son **modelos estructurados**, pero simplificados, con un número reducido de componentes intracelulares (dos, tres o cuatro), que se puedan medir, y, por lo tanto, obtener los parámetros por regresión de datos experimentales. Pero dichos modelos tienen una tarea pendiente, deben ser capaces de explicar o de **relacionar variables**, observaciones o fenómenos, que no sean capaces de explicar los modelos no estructurados, más sencillos.

La gran dificultad de desarrollar y aplicar modelos estructurados es, fundamentalmente, de análisis. La metodología es en todo similar a la desarrollada para determinar modelos cinéticos de redes de reacciones (García-Ochoa y Romero, 1993), siendo las principales herramientas matemáticas a utilizar la regresión múltiple no lineal (Marquardt, 1963), aplicando una solución de multirrespuesta a un problema de dicha naturaleza. Pero como se ha indicado, el modelo tiene que ser simplificado, con un número de componentes clave reducido, de cuatro a ocho parece un número razonable, que hay que medir. Algunos de estos compuestos son intracelulares: DNA, RNA, proteínas, ATP, etc, son los más frecuentes a determinar. Por ello, es necesario medir éstos y otros componentes, calcular parámetros por ajuste de datos experimentales, y reproducir dichos datos.

Los **modelos segregados** están especialmente indicados y quizás sólo en esos casos, para describir el crecimiento de microorganismos filamentosos de los que se obtienen productos de gran interés.

La necesidad de aumentar la complejidad de los modelos cinéticos para describir la evolución de procesos microbianos es clara, sin embargo el propósito de los modelos metabólicos y, especialmente de los modelos químicamente estructurados, entra dentro del desarrollo de la denominada **Ingeniería Metabólica** (Bailey, 1991; Stephanopoulos, 1991). La utilización de microorganismos como fábricas de productos sumamente específicas ha llevado al desarrollo de herramientas para conseguir mejorar el rendimiento del compuesto deseado. Durante bastante tiempo, la citada mejora se ha realizado por mutagénesis al azar de cepas microbianas o por cambio en las condiciones del cultivo. Este tipo de trabajo se llevaba a cabo porque muchos cambios genéticos del microorganismo potencialmente beneficiosos no eran evidentes. Incluso, los sistemas enzimáticos que gobiernan los “cuellos de botella” del metabolismo celular pueden estar situados lejos del sistema enzimático que finalmente sintetiza el compuesto bioquímico deseado. En muchos casos, las reacciones energéticas del metabolismo primario deben ser reconducidas para aumentar la productividad (Vallino y Stephanopoulos, 1993).

Durante las dos últimas décadas, se ha ido desarrollando una técnica más racional para conseguir la producción óptima del producto deseado (Bailey, 1991), tratando por un lado de identificar la reacción crítica o cuello de botella del metabolismo en la producción del compuesto deseado y por otro, minimizar esfuerzos en la optimización del proceso. Esta técnica es la denominada **Ingeniería Metabólica**.

En los años 70 (Heinrich y Rapoport, 1974), comenzó el estudio de la identificación de los citados cuellos de botella, a partir de la definición de ciertos coeficientes (de control) y ciertas relaciones entre ellos (teoremas). En realidad, se trataba de un análisis de sensibilidad del sistema que proporciona una base cuantitativa para el estudio de la regulación de sistemas metabólicos. El desarrollo de estos estudios se realizó, principalmente, durante la segunda mitad de la década de los años 80 (Fell y Sauro, 1985; Kell y Westerhoff, 1986; Reder, 1988; Westerhoff y Kell, 1989). Para su aplicación, es preciso el **análisis de compuestos intracelulares**, difícilmente analizables -se ha propuesto realizar su seguimiento mediante isótopos de C (Zupke y Stephanopoulos, 1994), por lo que se ha llegado a intentar la simulación de estas rutas metabólicas *in vitro* (Delgado y col., 1993).

A principios de los años 90 ya se encuentran revisiones completas sobre estos estudios (Fell, 1992; Liao y Delgado, 1993); sin embargo, su aplicación práctica no se encuentra extendida.

La identificación del sistema metabólico, y su influencia en la producción del metabolito de interés, se ha abordado desde el **punto de vista estequiométrico** (Hamer, 1989; Noorman y col., 1991; Goel y col., 1993; Vallino y Stephanopoulos, 1993); la razón principal de este cambio de estrategia es el gran error que conlleva la determinación de los coeficientes de control y elasticidad necesarios, así como la necesidad de conocer en profundidad la cinética enzimática de la red de reacciones que forman la ruta metabólica estudiada (Pons y col., 1996). En los antecedentes citados, se emplea un método que denominan de “balance de materia”, suponiendo para los metabolitos intermedios un estado pseudoestacionario, aproximación que evita la necesidad de su medida. Caben destacar tres grupos de investigación en la aplicación de esta herramienta de la Ingeniería Química a procesos de producción microbianos: el grupo de Delft (Holanda) (Noorman y col., 1991; De Jong-Gubbels y col., 1995; Gulik y Heijnen, 1995; Vanrolleghem y col., 1996), el grupo de Michigan (E.E.U.U.) (Varma y col., 1993; Varma y Palsson, 1994a y 1994b; Varma y Palsson, 1995), y, por último, el grupo de Lyngby (Dinamarca), que ya en su libro sobre Ingeniería de la Biorreacción (Nielsen y Villadsen, 1994) incorporan este estudio en el capítulo de análisis estequiométrico de reacciones, como paso previo al desarrollo de modelos cinéticos de este tipo de procesos (Nielsen y Villadsen, 1992; Jorgensen y col., 1995; Noronha Pissara y col., 1996).

La utilidad potencial que Varma y Palsson (1994) asignan en su revisión a esta técnica es amplísima: la interpretación de datos experimentales, el diseño de métodos para trabajar con técnicas de Ingeniería Genética, la formulación de medios óptimos, la optimización de las condiciones de operación y el diseño de bioreactores para bioprocesos. Todo ello alcanzable con cierta sencillez, aunque sigue siendo necesario el análisis de los “componentes clave” obtenidos a partir del estudio estequiométrico, ya que además, el número de compuestos intracelulares que es necesario analizar está en función de las simplificaciones empleadas en el citado estudio (*lumping* o agrupación de moléculas similares, hipótesis de estado pseudoestacionario, etc.).

Bailey (1995) destaca la aportación de la metodología que la Ingeniería Química ha desarrollado en el estudio de reacciones químicas complejas, en el desarrollo y optimización de procesos de producción microbianos. Por tanto, hoy día parece que se puede trasladar la metodología desarrollada en el estudio de redes complejas de reacción (García-Ochoa y Romero, 1993) al planteamiento de modelos cinéticos para este tipo de procesos. No obstante, hay que tener presente que es necesario tener en cuenta otros fenómenos para el cambio de escala de estos procesos, como ya se indicó al comienzo de este capítulo, estos son los relacionados con la **transferencia de oxígeno** y el **daño celular** o *stress* hidrodinámico que se puede causar al microorganismo por el propio fenómeno de la energía involucrada para aumentar la transferencia de oxígeno.

1.3.- GOMA de XANTANO

El xantano es un biopolímero de origen microbiano. En el término biopolímero se incluyen un gran número de moléculas de elevado peso molecular, tales como ácidos nucleicos, polisacáridos y lípidos, producidos por una amplia variedad de sistemas biológicos (Higgins y col., 1985). Desde un punto de vista industrial han tenido importancia los biopolímeros denominados “**gomas**”. En términos prácticos o funcionales, las gomasson compuestos de peso molecular elevado, con propiedades coloidales que, en un disolvente adecuado o agente suspendedor, producen geles o suspensiones de elevada viscosidad. En la industria, técnicamente, se emplea el término “goma” referido a polisacáridos obtenidos de plantas o animales, así como a sus derivados, que son dispersables en agua fría o caliente para producir geles o disoluciones viscosas.

La importancia industrial de las gomassse fundamenta en dos características importantes:

- La capacidad para alterar las propiedades de flujo de agua.
- La posibilidad de formar geles capaces de actuar como emulsificantes, adhesivos, floculantes, formadores de película, lubricantes, reductores de fricción y enlazadores.

Según la fuente de obtención, las gomassse pueden clasificar en gomassnaturales modificadas o semisintéticas y sintéticas. Las gomassnaturales son las obtenidas a partir de plantas (semillas, algas, cereales, tubérculos), microorganismos (bacterias, hongos) o animales (leche, huesos). Las gomasssemisintéticas se pueden obtener también de plantas y microorganismos pero la molécula obtenida es modificada químicamente y, por último, están las gomassobtenidas por síntesis química o gomasssintéticas.

Los biopolímeros obtenidos mediante procesos microbianos presentan ciertas ventajas respecto a las que se extraen de plantas (Sutherland, 1983; Pace, 1987; Galindo, 1988):

- Su producción no depende de las condiciones climáticas, contaminación marina o limitaciones de la cosecha.
- La variabilidad en la calidad y cantidad del producto es menor, ya que las gomassproducidas por plantas varían su composición según las necesidades metabólicas de las mismas.

- Finalmente, a nivel microbiano se puede realizar una manipulación genética que permita obtener gomas con propiedades reológicas fijadas, lo cual está lejos de conseguirse con las especies vegetales.

Entre los biopolímeros que están teniendo mayor potencial de comercialización se encuentran los polisacáridos de origen microbiano. Desde finales de los 50 se han venido publicando numerosos trabajos sobre la producción de polisacáridos de origen microbiano, la mayor parte no explotados comercialmente. Las investigaciones que han proporcionado mejores resultados fueron las realizadas por los laboratorios N.R.R.L. del Departamento de Agricultura de Estados Unidos, que a finales de los 50 comenzaron una investigación exhaustiva sobre las aplicaciones industriales de biopolímeros microbiológicos. El dextrano, sintetizado por la bacteria *Leuconostoc mesenteroides*, fue el primer polisacárido microbiano producido y utilizado en la obtención de sustituyentes del plasma sanguíneo. A éste le siguió el **xantano**, que luego cobró mucha mayor importancia.

Los polisacáridos de origen microbiano son macromoléculas orgánicas formadas por cadenas de monosacáridos, unidos entre sí mediante enlaces glucosídicos. Son uno de los tipos de moléculas naturales más comunes en los seres vivos, siendo frecuentemente producidas por bacterias, levaduras, hongos y algas. Su síntesis está relacionada con distintas funciones biológicas, tales como conseguir una reserva energética, formar parte de las membranas celulares, actuar como barrera protectora contra el ataque de virus y anticuerpos y proteger al microorganismo de la desecación (Petitt, 1979; Aspinall, 1982; Pace, 1987).

Los polisacáridos, dependiendo de la constitución de la cadena, pueden clasificarse en **homopolisacáridos**, cuando contienen un único tipo de azúcar, tal como glucosa, fructosa o manosa -como por ejemplo el dextrano, el levano y el escleroglucano- y **heteropolisacáridos**, cuando contienen dos o más azúcares, como glucomananos o arábigo-xilanos -como la goma xantano-. Desde otro punto de vista, los polisacáridos microbianos pueden clasificarse, según su origen, en tres grandes grupos (Margaritis y Zajic, 1978): polisacáridos intracelulares, polisacáridos estructurales y polisacáridos extracelulares. Estos últimos tienen distintas funciones biológicas; unos son producidos por bacterias, dando lugar a cápsulas microbianas que rodean su pared; otros forman una película viscosa, en la parte exterior de la pared celular, que tiene la capacidad de difundirse al medio líquido donde se encuentra el microorganismo.

La “goma de xantano” fue descubierta a finales de los 50, como ya se ha indicado, por los Northern Regional Research Laboratories (N.R.R.L.) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, durante unos trabajos de investigación sobre las aplicaciones industriales de polisacáridos microbiológicos y la utilización de excedentes agrícolas. Los estudios realizados mostraron que el polisacárido, producido por la bacteria *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459, poseía propiedades muy interesantes. Propiedades que hicieron pensar que el polisacárido podría suplir, por sus mejores características reológicas, a otras gomas naturales y sintéticas solubles en agua (Kennedy y Bradshaw, 1984; Kang y Pettit, 1993).

Su importancia industrial se basa en su capacidad de controlar la reología de los sistemas de base acuosa. Incluso a bajas concentraciones, las soluciones de goma de xantano presentan un alto grado de viscosidad, en comparación con disoluciones de otros polisacáridos, como carboximetil celulosa, goma de guar y de garrofin (Rocks, 1971; Cottrell y Kang, 1978; Pettit, 1979; Casas, 1989).

Las soluciones de xantano tienen gran estabilidad y compatibilidad con sales, excepto con iones polivalentes a valores elevados del pH (Margaritis y Zajic, 1978). Las soluciones, especialmente en presencia de electrolito, tienen una estabilidad térmica excelente, y su viscosidad, en presencia de cantidades moderadas de electrolito (0,1% NaCl), es independiente del pH en el intervalo de 5 a 9 (Margaritis y Zajic, 1978).

El xantano presenta una gran cantidad de **aplicaciones** industriales, debido a la alta viscosidad que proporciona en disolución, incluso a bajas concentraciones, siendo la consistencia de dichas disoluciones muy estable en amplios intervalos de temperatura, pH y pK (Margaritis y Zajic, 1978). Por ello, presenta un amplio abanico de aplicaciones en gran cantidad de industrias. En la Tabla 1.2 se recogen las aplicaciones más importantes de la goma xantano.

En general, las casas comerciales establecen dos calidades del producto: grado alimentario y grado técnico. Su presentación es generalmente en forma de sólido, aunque en aplicaciones específicas en el campo de la recuperación del petróleo utilizan caldos de fermentación clarificados. De cualquier forma, el xantano debe cumplir una serie de requisitos referentes a sus características físicas y químicas.

TABLA 1.2.- Aplicaciones del xantano en los diferentes tipos de industrias.

INDUSTRIA	APLICACION	CONCENTRACION (%)	FUNCIONES
ALIMENTARIA	Aderezos para ensaladas	0,1 - 0,5	Facilita el vertido y una buena adherencia; mantiene en suspensión las especias
	Productos de pastelería y panadería	0,1 - 0,4	Retiene el agua, mejora la textura
	Bebidas	0,05 - 0,2	Mejora la palatabilidad, estabiliza
	Productos instantáneos	0,05 - 0,2	Contribuye a dar cuerpo, proporciona solubilidad en frío y en caliente
	Alimentos enlatados	0,1 - 0,3	Control de viscosidad durante el procesamiento
	Sopas, salsas y jugos	0,05 - 0,5	Mejora la textura, contribuye a dar cuerpo
	Helados y alimentos congelados	0,05 - 0,2	Controla la formación de cristales; contribuye a la textura cremosa
	Confitería	0,1 - 0,4	Proporciona estabilidad térmica; facilita el procesamiento
	Productos lácteos	0,05 - 0,2	Inhibe la sinéresis, estabiliza la emulsión
	Productos dietéticos	0,3 - 0,5	Mejora la textura, estabiliza, bajo contenido calórico
	Productos cárnicos	0,2 - 0,5	Estabiliza; retiene el agua; inhibe la sinéresis
COSMETICA	Pastas dentífricas	0,7 - 1,0	Proporciona fácil extracción de los tubos y buena permanencia en el cepillo
	Cremas y lociones	0,2 - 0,5	Estabiliza las emulsiones, proporciona consistencia cremosa
	Champúes	0,2 - 0,5	Controla la reología
FARMACEUTICA	Suspensiones y emulsiones	0,1 - 0,5	Estabiliza las emulsiones y proporciona estabilidad frente a las fluctuaciones térmicas
	-----Tabletas-----	0,5 - 1,0	Prolonga el tiempo de contacto de los ingredientes activos
ALIMENTACION ANIMAL	Sucedáneos de leche	0,05 - 0,2	Estabiliza la suspensión de los ingredientes insolubles
	Alimentos enlatados para animales domésticos	0,1 - 0,4	Evita la sinéresis, contribuye a dar cuerpo a los jugos
VARIOS	Productos agroquímicos	0,1 - 0,3	Suspende los ingredientes activos; controla la adherencia del escurrido
	Limpiadores y pulimentos	0,2 - 0,7	Proporciona estabilidad frente a valores extremos de pH, prolonga el tiempo de contacto
	Pinturas	0,1 - 0,3	Controla la reología
	Estampado de textiles y alfombras	0,2 - 0,5	Controla la migración el color; mejora el procesamiento
	Adhesivos	0,1 - 0,3	Controla la penetración
	Industria papelera	0,1 - 0,2	Controla las propiedades de flujo
	Minería	0,2 - 0,3	Controla la sedimentación en procesos de separación, mejora la estabilidad de la espuma
	Tintas	0,05 - 0,1	Controla la reología
	Esmaltes cerámicos	0,3 - 0,5	Proporciona buena estabilidad de sólidos en suspensión
EXTRACCION DEL PETROLEO	Perforación	0,1-0,4	Proporciona buena estabilidad frente a la sal, temperatura y cizallado
	Recuperación forzada del petróleo	0,05 - 0,2	Confiere estabilidad, buena movilidad y elasticidad en la inyección de polímeros

En cuanto al **proceso de producción y purificación**, el xantano se obtiene industrialmente mediante un proceso de fermentación sumergida desarrollado en los años sesenta. En la Figura 1.9 se muestra esquemáticamente, el diagrama de producción para la obtención del polímero. El desarrollo del proceso se puede resumir en las siguientes fases:

- Producción del polisacárido
- Aislamiento y purificación

• **Producción del polisacárido:** para llevar a cabo el proceso, son necesarias unas etapas previas, como la conservación, mantenimiento y crecimiento de la bacteria con el fin de preparar el inóculo que se empleará posteriormente en la citada producción. En cualquier etapa del proceso, es fundamental mantener la esterilidad para evitar posibles contaminaciones. Las etapas de conservación de la cepa, así como el crecimiento del microorganismo, son críticas en el proceso, ya que el estado del microorganismo en el reactor influirá de forma notable, tanto en la duración de la fase de latencia durante la producción como en la calidad del xantano que se obtenga. Las condiciones de fermentación son muy importantes, ya que tanto el crecimiento de la bacteria como la biosíntesis del xantano se encuentran afectadas por numerosas variables (Santos 1993, García-Ochoa y col., 1997): el inóculo previo, la composición del medio de cultivo, la aireación y agitación del medio, el pH del medio de cultivo y la temperatura de fermentación

• **Aislamiento y Purificación:** una vez obtenido el caldo resultante, es precisa la eliminación de las bacterias del mismo para posteriormente obtener el xantano. Es necesaria una etapa de desactivación y **eliminación de las bacterias** -pasteurización y posterior clarificación-, seguida de la obtención del xantano, generalmente mediante **precipitación** con disolventes orgánicos. La repercusión del coste de esta etapa, sobre el coste final del proceso es muy importante, debido a que los caldos son muy viscosos y el mezclado con cualquier reactivo necesita un aporte de energía elevado, siendo necesaria la dilución en algunas etapas del proceso. El xantano se somete posteriormente a tratamientos de **lavado, secado y molienda**, siendo necesario evitar efectos como la degradación, la decoloración o la pérdida de solubilidad que puedan afectar a la propiedades físico-químicas del polisacárido.

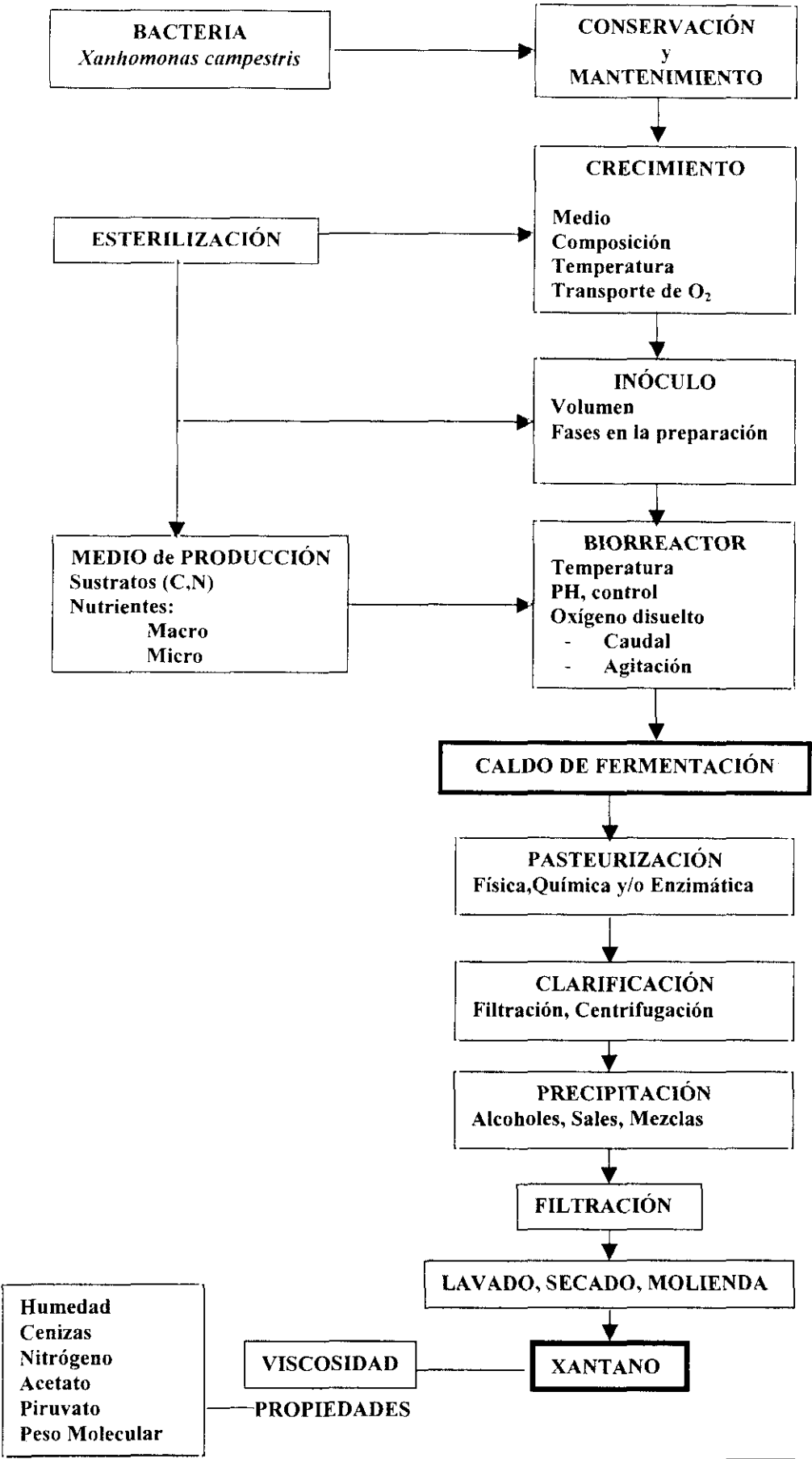


Figura 1.9.- Esquema del proceso de producción del xantano

La **estructura química** de la molécula de xantano es básicamente similar a la molécula de celulosa. La goma de xantano contiene manosa, glucosa y ácido glucurónico. Cada bloque repetido contiene cinco unidades de azúcar -dos unidades de glucosa, dos unidades de manosa y una unidad de ácido glucurónico- que forman una cadena principal y una cadena lateral (ver Figura 1.10). La cadena principal está constituida sobre unidades de β -D-glucosa enlazadas a través de las posiciones 1 y 4, como sucede en el caso de la molécula de la celulosa. La cadena lateral consiste en las dos unidades de manosa y la unidad de ácido glucurónico. La unidad terminal β -D-manosa está unida glicosídicamente a la posición 4 del ácido glucurónico, que vuelve a unirse glicosídicamente con la posición 2 de la α -D-manosa (Jansson y col., 1975; Kennedy y Bradshaw, 1984). Esta cadena lateral de tres azúcares se une a la posición 3 de cualquier otro residuo de glucosa de la cadena principal. La distribución de las cadenas laterales es desconocida. Alrededor de la mitad de los residuos de D-manosa terminales contienen un residuo de ácido pirúvico, unido vía grupo ceto a las posiciones 4 y 6 de la citada molécula de azúcar. La distribución de estos grupos piruvato también es desconocida. La unidad D-manosa terminal contiene un grupo acetilo en la posición 6 (Kennedy y Bradshaw, 1984). Debido a la presencia de las unidades de ácido pirúvico y ácido glucurónico en la molécula, el xantano es un polisacárido aniónico.

La distribución de pesos moleculares es amplia, el peso molecular del polímero varía entre $2 \cdot 10^6$ y $20 \cdot 10^6$ Daltons. En disolución acuosa, a baja temperatura, presenta un ficticio incremento en el peso molecular, como consecuencia de la tendencia que tienen estos polímeros a formar estructuras ordenadas de las moléculas en disolución (estructura terciaria). En el xantano se han detectado dos conformaciones -hélice y ovillo-, dependiendo de la temperatura de disolución (Horton y col., 1985; García-Ochoa y Casas, 1993).

El hecho de que se trate de un polisacárido ramificado explica, en parte, la extraordinaria capacidad espesante y de estabilidad que presentan las disoluciones acuosas de esta goma, lo que ha hecho que sus aplicaciones industriales sean muy amplias, incluyendo la industria alimentaria, la recuperación forzada del petróleo, la industria papelera, etc, como ya se ha indicado previamente. Existen diversos derivados del xantano tales como xantano desacetilado, carboxymetil éter y el propilen-glicol éster. Sin embargo, hasta el momento, ninguno de ellos tiene la importancia industrial del biopolímero (Kang y Pettit, 1993).

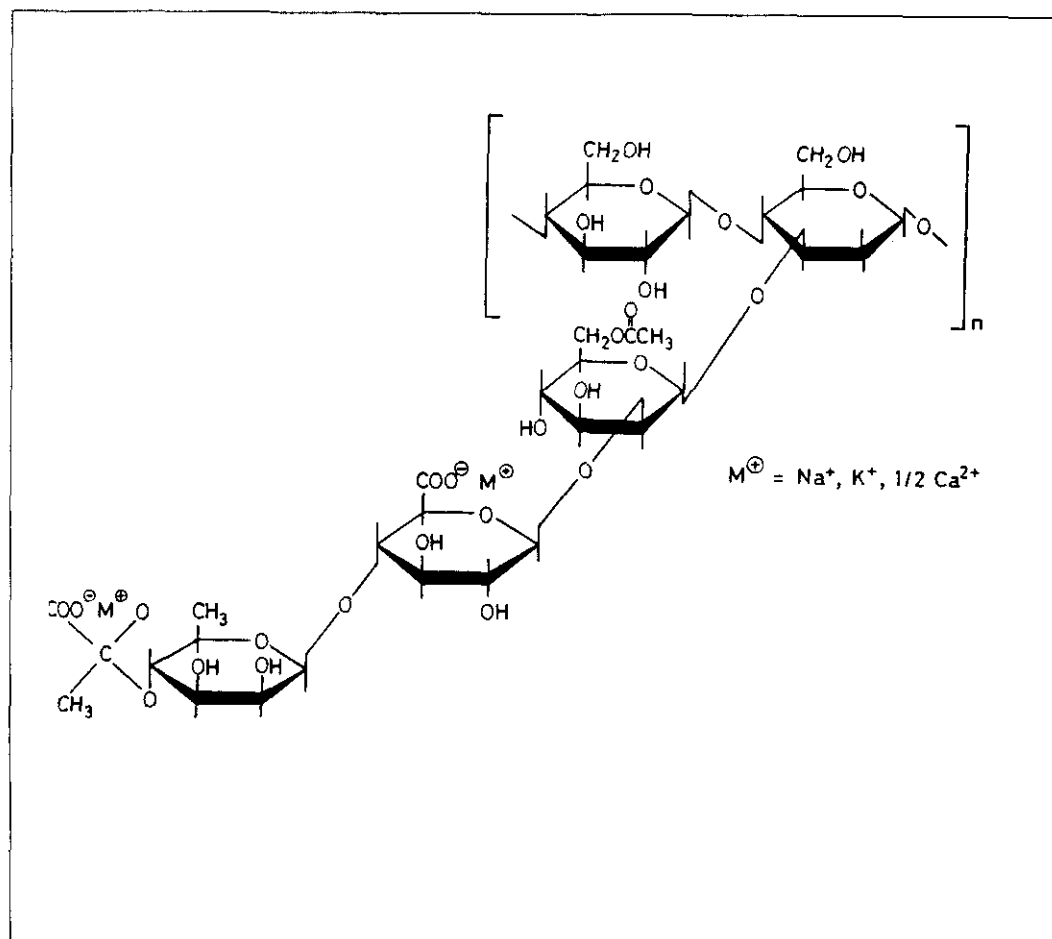


Figura 1.10.- Esquema de la molécula de xantano

Se han realizado muchos trabajos para estudiar y optimizar las condiciones de producción industrial del biopolímero (Moraine y Rogovin, 1966, 1971, 1973; Cadmus y col., 1978; Davidson, 1978; Kennedy, 1982; De Vuyst y col., 1987a y 1987b; Hassler y Doherty, 1990; Shu y Yang, 1991; Santos, 1993; García-Ochoa y col., 1995a). Los procesos de producción pueden ser mejorados con el conocimiento de la ruta de síntesis del xantano por la bacteria *Xanthomonas campestris*. Sin embargo, en la actualidad, es aún limitada la información existente sobre la síntesis de xantano, ya que se trata de un proceso complejo en el que interviene un sistema multienzimático (Santos, 1993).

Sutherland (1977) generaliza la síntesis de polisacáridos extracelulares indicando que se lleva a cabo en cuatro grandes procesos: consumo de sustrato, formación de intermediarios metabólicos, producción y modificación del polisacárido. En la Figura 1.11 se muestra el mecanismo propuesto para la biosíntesis del xantano (Sutherland, 1977; Pace, 1980; Kennedy

1.3.1.- *Xanthomonas campestris*

Xanthomonas es un género de la familia *Pseudomonaceae*. Son bacilos rectos aislados, que miden de 0,4 a 0,7 μm de ancho y de 0,7 a 1,8 μm de largo. No poseen vaina ni se conocen estados de reposo. Son bacterias Gram negativas móviles, ya que poseen un flagelo polar. Estos microorganismos son aerobios obligados y su metabolismo es estrictamente respiratorio, nunca fermentativo. Son bacterias no desnitrificantes y no reducen los nitratos, son catalasa positivas y oxidasa negativas (Bradbury, 1984), forman colonias usualmente amarillas, lisas y viscosas.

La cápsula de este tipo de bacterias no presenta una estructura especial, por observación microscópica con técnicas simples de tinción. Sin embargo, la tinción capsular con tinta Indio ha llevado a observar cápsulas en muchos cultivos de *Xanthomonas* y especialmente de *X. campestris* (Bradbury, 1984). La producción de gran cantidad de estos polisacáridos capsulares -o goma de xantano- se lleva a cabo cuando se emplean medios ricos en hidratos de carbono.

En cuanto a la pared celular, es similar a otras células Gram negativas. Ya se ha comentado que poseen un solo flagelo, observable por tinción y en microscopio electrónico en cultivos jóvenes. Su longitud suele ser de 1,79 μm , pero ocasionalmente varía entre 2 y 3 μm . No se ha observado pili en *Xanthomonas*, pero esto no indica la ausencia de estas estructuras. En lo referente a pigmentos, la mayoría de las bacterias del género *Xanthomonas* presentan pigmentos amarillos -denominados xanthomonadinas-, que son polienos aril-bromados. En la Figura 1.12. se puede observar una fotografía de *Xanthomonas campestris* realizada mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) donde se aprecia una célula en la fase de división, y se ve claramente el flagelo polar así como la morfología de la bacteria. Las especies de *Xanthomonas* son quimioorganotrofas, son aerobias estrictas y emplean el oxígeno como aceptor de electrones. Son bacterias oxidasa negativas, capaces de crecer en un medio sintético puro, conteniendo minerales, nitrógeno amónico y una fuente de carbono como glucosa y suplemento de aminoácidos (Bradbury, 1994).

y Bradshaw, 1984; Sutherland, 1985). Hay que destacar la importancia de los lípidos intermedios de la síntesis, que parecen ser los que transportan el monómero de xantano hasta la membrana celular y gracias a ellos, se unen a diferentes monosacáridos para la formación del esqueleto carbonado (Sutherland, 1975 y 1977). El residuo de piruvato proviene del fosfoenolpiruvato (P.E.P) - obtenido generalmente por vía de Entner-Doudoroff, que es la ruta por la que la bacteria lleva a cabo el metabolismo de la glucosa (Bradbury, 1984; Pons y col., 1989)- uniéndose, finalmente, al esqueleto carbonado ya formado (Ielpi y col., 1981a y 1981b).

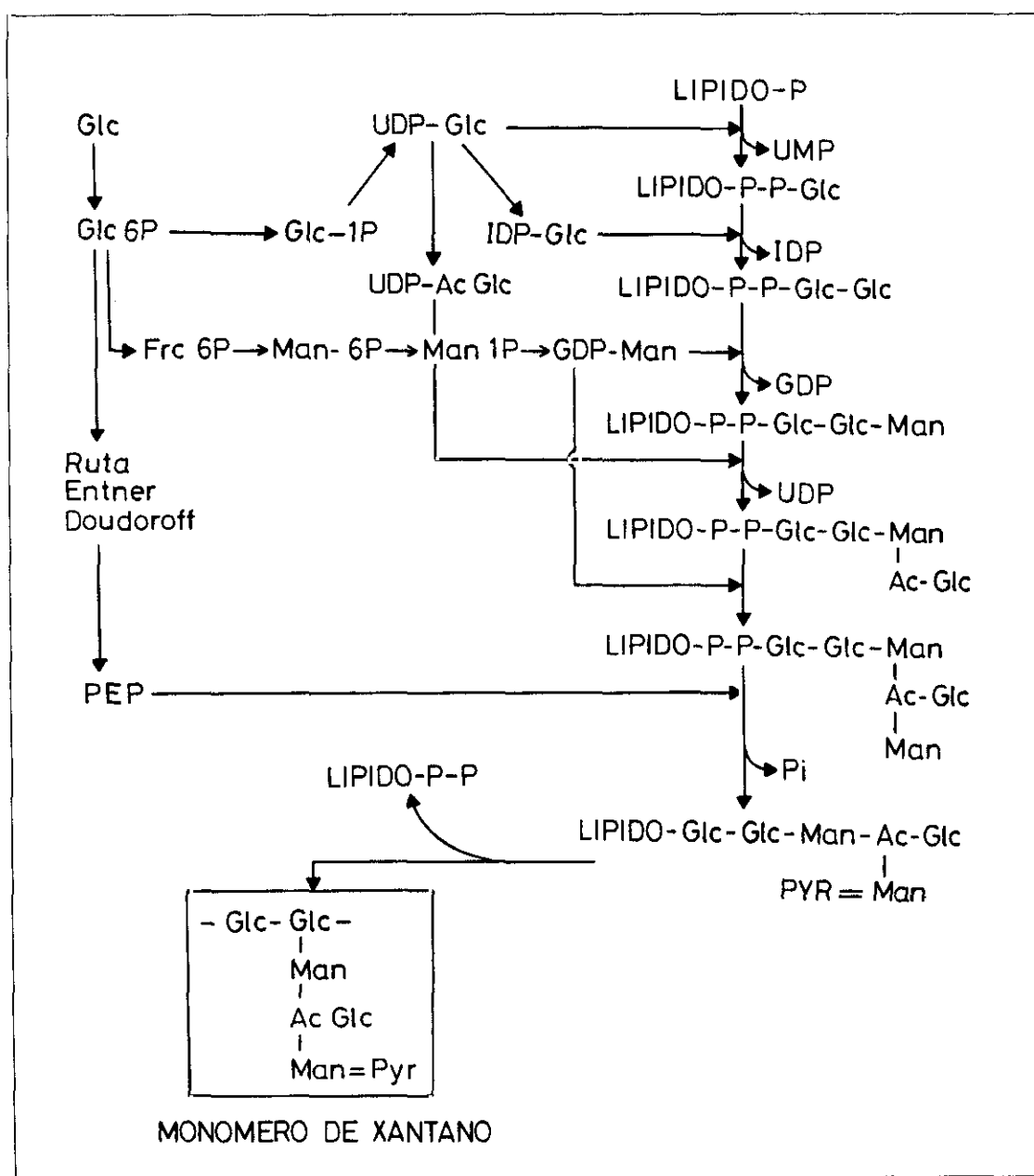


Figura 1.11.- Esquema de reacciones de la síntesis de xantano.

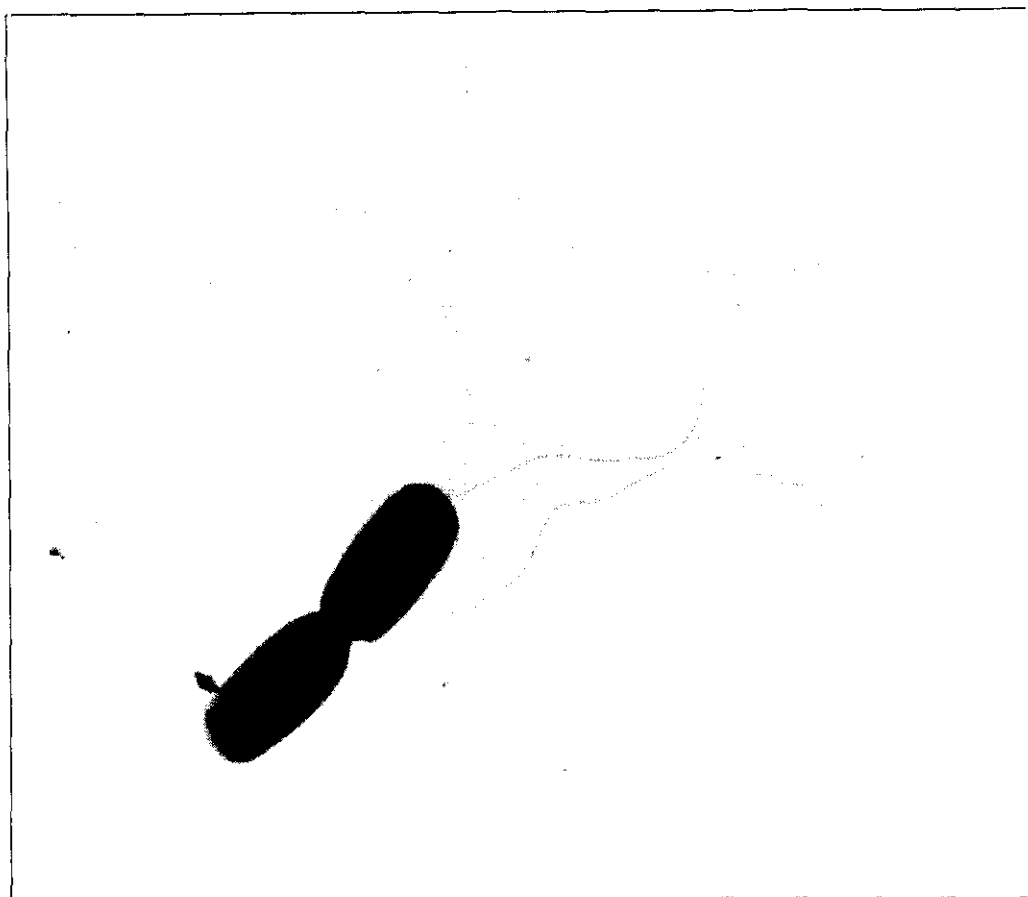


Figura 1.12.- Fotografía de *Xanthomonas campestris* realizada mediante MET (12000 aumentos).

En cuanto al metabolismo de carbohidratos, oxidan la glucosa, siendo la ruta de Entner-Doudoroff la predominante en el catabolismo de la glucosa, solo desvían de un 8 a un 16% de la glucosa a la ruta de las pentosas fosfato. El ciclo de la hexosa no se emplea de forma significativa. Tanto el ciclo del ácido tricarboxílico como el ciclo del glioxilato están presentes en todo el género *Xanthomonas* (Bradbury, 1984).

El xantano se produce por bacterias del género *Xanthomonas*; aunque es, principalmente, la especie *Xanthomonas campestris*, la más estudiada y empleada para llevar a cabo la producción. Se ha observado la síntesis de polisacáridos similares al xantano a partir de otras especies de *Xanthomonas* (Slodki y Cadmus, 1978). A partir de *X. mannihotis* se obtiene un polisacárido formado también por D-glucosa, D-manosa, ácido glucurónico y ácidos acético y pirúvico, aunque en diferentes relaciones molares, obteniéndose un 2,2% del polisacárido a

partir del 4 al 10% de azúcar. Si se emplea *X. phaseoli* se puede llegar a obtener hasta 10 g/L de una goma de características similares, con una composición similar, al xantano, pero con diferente relación molar entre los azúcares que lo forman. Otras especies, como *X. malvacearum*, *X. heredae*, *X. papavericola* y *X. vesicatoria*, producen polisacáridos formados por las mismas unidades de azúcar (Margaritis y Zadic, 1978; Bradbury, 1984). Es la goma sintetizada por *X. stewartii* la que presenta una clara diferencia con el resto, ya que las unidades de azúcar que la forman son D-glucosa, D-galactosa y ácido glucurónico (Slodki y Cadmus, 1978). La mayoría de las bacterias del género *Xanthomonas* producen una familia de polisacáridos extracelulares, cuyo papel parece ser proteger a las células de la desecación y otras condiciones adversas, ya que es, en realidad, la cápsula bacteriana (Bradbury, 1984). En la Tabla 1.3 se resumen la composición de diversos biopolímeros sintetizados por diferentes especies del género *Xanthomonas*.

Tabla 1.3.- Composición media (en porcentaje) de los diferentes polisacáridos sintetizados por las bacterias del género *Xanthomonas* (Kennedy y Bradshaw, 1984).

Especie	D-Glucosa	D-Manosa	Ac. D-Glucurónico	Piruvato	Acetato
<i>X. campestris</i>	30,1	27,3	14,9	7,1	6,5
<i>X. albilineans</i> 1739 ^a	30,2	27,5	13,9	5,1	5,8
<i>X. albilineans</i> 2257 ^a	25,2	26,1	14,2	5,8	5,1
<i>X. axonopodis</i> 457	30,6	28,6	13,7	7,2	5,5
<i>X. fragaria</i> 1469 ^a	32,5	28,5	15,1	7,0	3,9
<i>X. fragaria</i> 1822	24,6	26,1	14,0	4,9	5,5
<i>X. gummisudans</i> 2182	34,8	30,7	16,5	4,7	10,0
<i>X. juglandis</i> 411	33,2	30,2	16,8	6,9	6,4
<i>X. manihotis</i> 4459	33,3	28,7	16,7	7,6	6,8
<i>X. phaseoli</i> 556	29,1	34,2	17,8	7,7	1,8
<i>X. phaseoli</i> 1128	30,9	28,6	15,3	1,8	6,4
<i>X. vasculorum</i> 702	34,9	30,2	17,9	6,6	6,3
<i>X. vasculorum</i> 796	22,2	26,2	15,3	5,4	8,8

^a contiene D-Galactosa

Como ya se ha comentado, la especie más ampliamente utilizada para la producción de xantano es *Xanthomonas campestris*. Aunque esta bacteria no es difícil de cultivar en medios estándar de laboratorio, se han observado variaciones en las cepas, tanto en cultivo en continuo (Silman y Rogovin, 1972), como en discontinuo (Cadmus y col., 1976), que afectan a la calidad y al rendimiento del xantano producido.

Se han descrito tres tipos diferentes de cepas de esta bacteria (Slodki y Cadmus, 1978; Cadmus y col., 1976 y 1978; Jeanes y col., 1976; Kidby y col., 1977):

- Cepa L (Large): presenta colonias mucoides amarillas brillantes, de 4 a 5 mm de diámetro. Proporciona buen rendimiento en xantano y con un nivel alto de piruvato (también influye el medio de producción empleado).
- Cepa Sm (Small): colonias mucoides de color amarillo más oscuro que la cepa L y de unos 2 mm de diámetro. Proporciona menor rendimiento en xantano que la cepa L y con menor contenido en piruvato.
- Cepa Vs (Very Small): produce colonias no mucoides, de color indefinido y de un diámetro máximo de 1 mm. No produce xantano apreciablemente y no es muy frecuente.

Parece que las cepas Sm y Vs se producen por degeneración de la cepa L; normalmente debido a un envejecimiento del cultivo, que puede ser acelerado por una conservación deficiente. Por lo tanto, es necesario mantener la bacteria como cepa L, para obtener un xantano con buenas propiedades y con buen rendimiento.

1.3.2.- Producción de Xantano

Un factor importante a tener en cuenta es el estado del microorganismo empleado como **inóculo** en la producción, pues afecta a la duración del proceso y a la composición del xantano obtenido. Los diferentes autores han abordado este problema creando un inóculo a partir de varios ciclos de crecimiento, es decir, en etapas (Rogovin y col., 1961; Silman y Rogovin, 1970 y 1972; Moraine y Rogovin, 1971; Cadmus y col., 1976 y 1978; De Vuyst y col., 1987a y b;

Peters y col., 1989; Pons y col., 1989 y 1990; Santos, 1993). El tiempo necesario para la preparación del inóculo está influido por la composición del medio empleado para el desarrollo del microorganismo- algunos autores varían la composición de una etapa a otra (Rogovin y col., 1961; Cadmus y col., 1978; Peters y col., 1989; Pons y col., 1989) - y por la temperatura empleada para el crecimiento de *X. campestris*, existiendo un intervalo óptimo de 25 a 30 °C, para llevarlo a cabo (Thonart y col., 1985; Shu y Yang, 1990).

En trabajos previos (Santos, 1993), tras un cuidadoso estudio, se ha concluido que el inóculo debe realizarse en dos etapas, para que de este modo el microorganismo se aclimate a las condiciones del fermentador, tanto al medio como a la agitación mecánica. La primera etapa del inóculo consiste en incubar el microorganismo en tubo de ensayo con medio YM, durante 12 horas a 28° C y 210 r.p.m., para, a continuación, pasarlo a un Erlenmeyer con medio YM-T e incubarlo durante 6,5 h, a 28 °C y 210 r.p.m..

El **medio de producción** empleado en los primeros estudios realizados sobre la producción de xantano (Rogovin y col., 1961 y 1965) era de tipo complejo; se empleaban sustancias abundantes en Estados Unidos para probar la síntesis del polisacárido (azúcar de maíz, CSL, etc.). El desarrollo del proceso de producción ha llevado a la propuesta de diferentes tipos de medios, entre los que todavía se encuentran sustancias complejas, como son la peptona (Kennedy y col., 1982; Pinches y Pallent, 1986; Lee y col., 1989; Pons y col., 1989 y 1990), extracto de levadura (Pons y col., 1989 y 1990; Shu y Yang, 1990 y 1991), CSL (Kennedy y col., 1982; De Vuyst y col., 1987a y b), extracto de Pharmamedia (Patton y Dugar, 1981) y DDS (Moraine y Rogovin, 1971; Silman y Rogovin, 1972; Cadmus y col., 1976; Kennedy y col., 1982). Sin embargo, en general, para mejorar el sistema de producción de xantano, poder controlar las concentraciones de los diferentes nutrientes que se incorporan al medio y observar su influencia en el proceso, se suele trabajar con medios sintéticos (Davidson, 1978; Cadmus y col., 1978; Souw y Demain, 1979 y 1980; Trilsbach y col., 1984; Tait y col., 1986; Peters y col., 1989; Schweickart y Quinlan, 1989; Suh y col., 1992).

Las fuentes de carbono más ampliamente utilizadas son glucosa y sacarosa (Moraine y Rogovin, 1966 y 1971; Silman y Rogovin, 1972; Cadmus y col., 1976 y 1978; Davidson, 1978; Souw y Demain, 1979 y 1980; Kennedy y col., 1982; Trilsbach y col., 1984; Thonart y col., 1985; Tait y col., 1986; Pinches y Pallent, 1986; Funahashi y col., 1987; De Vuyst y col., 1987a y b; Lee y col., 1989; Peters y col., 1989; Qadeer y Baig, 1989; Vashitz y Sheintuch,

1991; Zaidi y col., 1991; Suh y col., 1992). Sin embargo, parece que es la sacarosa, en concentración entre 20 y 40 g/L, la que proporciona mejores resultados (Souw y Demain, 1979; Funahashi y col., 1987; De Vuyst y col., 1987a; Santos, 1993).

Respecto al nutriente nitrogenado a emplear en la producción, existe una gran discrepancia en la literatura; mientras que hay autores que destacan el efecto beneficioso, sobre la producción del polisacárido, de fuentes nitrogenadas orgánicas o complejas (Souw y Demain, 1979 y 1980; Kennedy y col., 1982; Qadeer y Baig, 1989), otros autores comentan que es mejor, para el transporte en el caldo, cuanto menor y más sencilla sea la molécula empleada (Slodki y Cadmus, 1978). La idea general sobre el sustrato nitrogenado parece indicar que se debe emplear un compuesto orgánico (urea, ácido glutámico) o sustancias complejas (CSL, DDS). No obstante, Santos (1993) realizó una comparación de la producción obtenida cuando el nitrógeno se añade al medio de forma inorgánica, como amonio y cuando la fuente nitrogenada es de naturaleza orgánica, observando que, para la misma cantidad de nitrógeno, la cantidad de xantano producida con amonio era mayor que cuando se incluía una fuente nitrogenada de naturaleza orgánica.

En cuanto al resto de los nutrientes, su incorporación al medio se suele realizar de forma sintética, con compuestos inorgánicos; excepto en los casos en los que la sustancia compleja empleada como fuente nitrogenada (DDS) incorpore las cantidades necesarias de los citados nutrientes.

En los medios de producción se suele incorporar ácido cítrico, ya que se ha comprobado el efecto beneficioso en la producción de ciertos ácidos orgánicos añadidos en pequeñas cantidades en el medio (Souw y Demain, 1980; Trilsbach y col., 1984).

La **composición del medio** fue optimada en trabajos previos (García-Ochoa y col., 1992; Santos, 1993) mediante diseño factorial de experimentos. La composición de este medio aparece detallada en el capítulo 2 de esta Memoria y ha sido el medio empleado para la producción de xantano en el presente trabajo en todos los experimentos. La concentración óptima de amonio es de 0,257 g/L, concentraciones superiores pueden ocasionar un efecto tóxico en las células, pudiendo verse afectado tanto el crecimiento como la producción de xantano. Sin embargo, por motivos que luego se explicarán, la concentración de la fuente nitrogenada ha sido variada. En cuanto a la fuente de carbono se

ha empleado sacarosa en una concentración de 40 g/L, la cual es lo suficientemente elevada para favorecer la síntesis del polisacárido, pero no para tener efecto negativo en la producción por inhibición del crecimiento (Souw y Demain, 1979).

El resto de variables que influyen en el proceso de producción son: temperatura, agitación, caudal de aire y pH. En la Tabla 1.4 se muestra las condiciones de operación empleadas por diferentes autores en biorreactores tipo tanque agitado.

Tabla 1.4.- Condiciones de operación empleadas por diferentes autores para llevar a cabo la producción de xantano en un tanque agitado.

Autores	V (L)	Q (L/L/min)	N (r.p.m.)	T (°C)	pH
Cadmus y col. (1978)	10	1.5	225-300	20-30	6.8 (control)
Rogovin y col (1965)	227 2268	0.5	90-290 30-250	28	7
Moraine y Rogovin (1966)	---	1	1000	28	7
Moraine y Rogovin (1971)	8	1	500-1000	28	7, 7.1 (control)
Moraine y Rogovin (1973)	---	---	---	28	7 (control)
Souw y Demain (1980)	---	0.5	500	25	7 (control)
Pinches y Pallent (1986)	10 2.5	0.4	600 1000	30	7 (control)
De Vuyst y col. (1987)	6	1	250-700	28	7
Funahashi y col. (1987)	6	1	350-1200	30	7
Peters y col (1989)	---	0.3	200-800	28	7 (control)
Shu y Yang (1990)	---	1.16	800	20-34	7 (control)
Pons y col. (1990)	3.6	0.3, 0.6	500-900	29	6.9 (control)
Kennedy y col. (1982)	3.5	0.5	400-600	30	7 (control)
Schweikart y Quinlan (1989)	1.2	1	300-1300	26	7 (control)
Santos (1993)	1.5	1	210-1300	28	7

Como puede apreciarse en la tabla, la **temperatura** que se debe emplear para llevar a cabo la producción se encuentra en el intervalo de 25 a 33 °C. La gran mayoría de los autores emplean la misma temperatura en la preparación del inóculo que en la producción (Rogovin y col., 1961 y 1965; Moraine y Rogovin, 1966, 1971 y 1973; Silman y Rogovin, 1970 y 1972; Davidson, 1978; Souw y Demain, 1979 y 1980; Kennedy y col., 1982; Trilsbach y col., 1984;

Pinches y Pallent, 1986; Tait y col., 1986; Funahashi y col., 1987, De Vuyst y col., 1987a y b; Peters y col., 1989; Lee y col., 1989; Qadeer y Baig, 1989; Pons y col., 1989 y 1990; Zaidi y col., 1991; Suh y col., 1992). Sin embargo, se ha propuesto el empleo de temperaturas diferentes en ambas etapas del proceso (Thonart y col., 1985; Shu y Yang, 1990 y 1991).

En trabajos previos (Santos, 1993 y García-Ochoa y col., 1997) se determinó que la temperatura óptima para la producción de xantano es 28 °C, si bien no existe una gran diferencia con la temperatura de 31° C.

Debido a que *Xanthomonas campestris* es una bacteria estrictamente aerobia, la **transferencia de oxígeno** en la fermentación se convierte en una variable de gran trascendencia. En cada tipo de reactor las variables de operación que pueden afectar a la citada transferencia de oxígeno son diferentes. Como el reactor más empleado para la producción de xantano es el tipo tanque agitado, las condiciones de operación que más influyen son el caudal de aire y la agitación.

Aunque los valores del **caudal de aire** empleados son dispares (de 0,3 a 1,5 L/L/min), todos los autores mantienen constante la citada variable. Por tanto, la transferencia del oxígeno en el caldo depende únicamente de la **velocidad de agitación**. Sobre esta última variable citada, hay dos tendencias: por una parte hay autores que la mantienen constante durante toda la fermentación (Souw y Demain, 1980; Pinches y Pallent, 1986; Shu y Yang, 1990 y 1991), mientras que otros la van aumentando a medida que aumenta la viscosidad del caldo (Rogovin y col., 1961 y 1965; Moraine y Rogovin, 1971; Cadmus y col., 1978; Kennedy y col., 1982; Funahashi y col., 1987; De Vuyst y col., 1987a y b; Schweickart y Quinlan, 1989; Pons y col., 1990).

Diversos autores (Santos, 1993) han propuesto que la **velocidad de agitación** empleada debe ir incrementándose a medida que aumentar la viscosidad del caldo, para mejorar la transferencia del oxígeno, ya que los microorganismos se encuentran recubiertos de una capa de polisacárido que evita su rotura por efecto de la elevada velocidad de agitación, que es necesario alcanzar para mantener la concentración de oxígeno disuelto a niveles adecuados. Para un caudal de aire constante de 1 L/L/min, la velocidad de agitación inicial debe ser de 210 r.p.m. y tiene que ir aumentando a medida que crece la viscosidad del caldo en el biorreactor, hasta alcanzar un valor entre 800 y 1000 r.p.m..

Finalmente, respecto a la última de las variables citadas anteriormente, el **pH**, únicamente Thonart y col. (1985) proponen realizar la preparación del inóculo a un valor de 5, el resto de los autores comienzan la fermentación partiendo de un inóculo crecido a pH cercano al neutro y con el medio de producción ajustado también a un valor cercano a 7. La diferencia entre unos trabajos y otros radica en controlar o no esta variable durante la fermentación, e incluso se estudia la mejor base a emplear para realizar el citado control. Hay autores que señalan, de forma especial, el beneficio del control del pH durante la fermentación (Moraine y Rogovin, 1971), mientras que otros autores únicamente trabajan empleando el citado control, pero sin comentar si esta variable ha sido o no estudiada (Cadmus y col., 1978; Davidson, 1978; Souw y Demain, 1980; Patton y Dugar, 1981; Pinches y Pallent, 1986; Tait y col., 1986; Robinson y Wang, 1988; Pons y col., 1989; Lee y col., 1989; Peters y col., 1989; Schweickart y Quinlan, 1989; Shu y Yang, 1990 y 1991; Suh y col., 1992). Moraine y Rogovin (1971) señalan la mejoría que supone el empleo de hidróxido amónico como álcali para realizar el control del pH.

En la literatura, sin embargo, existe también un gran número de trabajos en los que se realiza la fermentación sin llevar a cabo el control del pH (Rogovin y col., 1961 y 1965; Moraine y Rogovin, 1966; Silman y Rogovin, 1970 y 1972; Souw y Demain, 1979; De Vuyst y col., 1987a y b; Funahashi y col., 1987). Santos (1993) y García-Ochoa y col. (1997) proponen realizar la producción sin control de pH pues no resulta beneficioso para la producción. Durante el periodo de crecimiento, el pH del medio prácticamente se mantiene constante en este valor, pero al llegar a la fase estacionaria de crecimiento el pH disminuye, si se controla esta variable la producción se detiene.

Finalmente, en la Tabla 1.5 se muestra la comparación entre la cantidad de xantano producido, así como el rendimiento obtenido, en las condiciones empleadas por Santos (1993) en comparación con otros autores en tanque agitado y en discontinuo. Como puede observarse, Shu y Yang (1990) obtienen mejor rendimiento en xantano que el obtenido en dicho trabajo, pero la concentración del polisacárido obtenida por estos autores es apenas la mitad que la obtenida por Santos (1993), siendo un factor más importante llegar a una concentración de xantano elevada. Sólo Funahashi y col. (1987) han obtenido la misma concentración de xantano, pero han necesitado un día más de tiempo de fermentación.

Desde que se comenzó a estudiar la síntesis del xantano, su producción se ha llevado a cabo en reactores tipo tanque agitado, realizándose la operación de forma discontinua. Existen, desde entonces, una gran cantidad de trabajos que, incluso en la actualidad, siguen llevando a cabo la fermentación en las mismas condiciones de operación y tipo de reactor (Rogovin y col., 1961 y 1965; Moraine y Rogovin, 1966, 1971 y 1973; Cadmus y col., 1976 y 1978; Souw y Demain, 1979 y 1980; Kennedy y col., 1982; Thonart y col., 1985; Dussap y Gros, 1985; Pinches y Pallent, 1986; De Vuyst y col., 1987a y b; Funahashi y col., 1987; Peters y col., 1989; Shu y Yang, 1990 y 1991; Pons y col., 1990). A partir de los años 70 comenzaron a realizarse estudios para llevar a cabo el proceso en continuo (Silman y Rogovin, 1970 y 1972; Davidson, 1978; Patton y Dugar, 1981; Trilsbach y col., 1984; Tait y col., 1986; Lee y col., 1989), aunque la producción a escala industrial se sigue realizando en operación discontinua, ya que el problema es evitar la contaminación del cultivo con microorganismos indeseables (Kennedy y Bradshaw, 1984) y la degeneración de las cepas. En los últimos años, han comenzado a realizarse trabajos en reactores diferentes al tanque agitado, como son columnas de burbujeo y airlifts (Pons y col., 1989 y 1990; Zaidi y col., 1991; Suh y col., 1992), los cuales, según estos autores, presentan ventajas en algunos aspectos respecto a los de tanque agitado mecánicamente, como menor stress hidrodinámico, aumento en la velocidad de transferencia de materia y calor, mejores condiciones de mezcla y menores limitaciones en el cambio de escala. Incluso se han empleado reactores prototipo, como es el T.O.R.U.S. (Krebser y col., 1988), llevándose a cabo el proceso, en todos los casos, de forma discontinua. En trabajos previos (Santos, 1993; García-Ochoa y col., 1997), se ha empleado un tanque agitado en operación en discontinuo. La Tabla 1.6. muestra de forma comparativa los resultados obtenidos por diferentes autores que llevan a cabo el proceso en diferentes tipos de biorreactores, apareciendo tanto la concentración de xantano alcanzada, como el rendimiento del proceso y el tiempo en que se alcanza la concentración que se especifica.

Tabla 1.5.- Producción de xantano y rendimientos obtenidos por los diferentes autores trabajando en tanque agitado y aereado

Autores	Y_p (%)(p/p)	t (h)	P (g/L)
Cadmus y col. (1978)	46	72-96	14
Rogovin y col. (1966)	67	96	15
Moraine y Rogovin (1966)	70	96	15
Moraine y Rogovin (1966)	73	40	14.6
Moraine y Rogovin (1966)	75	96	29
Souw y Demain (1980)	50	60	10.5
Pinches y Pallent (1986)	76	45	17
De Vuyst y col. (1987)	75	144	27.9
Funahashi y col. (1987)	66	96	30
Peters y col. (1989)	34	90	18.5
Shu y Yang (1990)	81	52	19
Pons y col. (1990)	65	50	13
Kennedy y col. (1982)	45	69	22.5
Schweikart y Quinlan (1989)	50	96	12.5
Santos (1993)	75	70	30

Tabla 1.6- Producción de xantano y rendimientos obtenidos en diferentes trabajos en operación discontinua y diferentes clase de biorreactores.

Autores	Y_p (%)(p/p)	t (h)	C_p (g/L)	Fermentador
Pons y col., 1990	59	80	12	Columna de Burbujeo
	65	50	13	Tanque agitado
Pons y col., 1989	50	120	20	Columna de Burbujeo
Zaidi y col, 1991	< 50	100	18	"Plugging jet"
Suh y col., 1992	50	80	25	Air lift
Kessler y col., 1993	45	49*	25	Air lift
Santos, 1993	75	70	30	Tanque agitado

* Fermentación en dos etapas, primera etapa 12 h en tanque agitado, no siendo considerado este tiempo en las 49 h de fermentación.

1.3.3.- Transporte de Oxígeno

El estudio de la transferencia de oxígeno en la producción de xantano es de suma importancia debido a dos aspectos fundamentales. Por un lado, la bacteria que lleva a cabo este proceso, esto es, *Xanthomonas campestris* es estrictamente aerobia, lo que quiere decir que el microorganismo necesita para crecer y producir el biopolímero, el oxígeno; este nutriente debe tomarlo de la fase líquida y debido a que su solubilidad en agua es muy pequeña, debe ser suministrado de forma continua al medio. Por otro parte, en la producción en discontinuo de xantano, la viscosidad del cultivo aumenta considerablemente como consecuencia de la acumulación del biopolímero, produciendo una significativa disminución de la transferencia de materia. En estas circunstancias, la velocidad de transporte de oxígeno controla, o influye notablemente, la velocidad del proceso global; por lo que el parámetro característico de este transporte, el coeficiente volumétrico de transferencia de materia, $k_{L a V}$, debe ser conocido.

Por otra parte, teniendo en cuenta que, para efectuar cambios de escala en fermentaciones aerobias, uno de los criterios más ampliamente utilizado es el de mantener valores similares de la concentración de oxígeno disuelto o su velocidad de transferencia, se entiende que la determinación de este parámetro sea de gran interés.

La importancia de la transferencia de materia gas-líquido en las biotransformaciones aerobias –donde la máxima concentración de producto alcanzable está generalmente limitada por la velocidad de transporte de oxígeno- hace que en los últimos años haya sido objeto de numerosos trabajos (Yagi y Yoshida, 1975; Figueiredo y Calderbank, 1979; Nishikawa y col., 1981a y b; Ogut y Hatch, 1988; Poizat y col., 1992; Nocentini y col., 1993; Roman y col., 1993; Pedersen y col., 1994; García-Ochoa y Gómez, 1998). Sin embargo, es escasa la información que existe sobre la influencia de las variables de operación en el coeficiente de transporte y su predicción, en los cultivos de elevada viscosidad (Margaritis y Zajic, 1978; Vashitz y col., 1989; Suh y col., 1992; Herbst y col., 1992; Gómez, 1995). Sin duda, esta falta de información en caldos con microorganismos se debe a que se supone que los datos obtenidos con caldos simulados –donde los trabajos han sido más extensos- son extrapolables a la fermentación en presencia de los microorganismos, sin tener los inconvenientes del trabajo con microorganismos (Dussap y col., 1985; Vlaev y Valeva, 1990; Kawase y col., 1992).

Como ya se ha comentado, en los procesos de fermentación aerobios es necesario proporcionar al microorganismo la cantidad de oxígeno suficiente para que éste satisfaga sus requerimientos metabólicos. La utilización de los nutrientes por parte de los microorganismos, principalmente la oxidación de la fuente de carbono y su posterior transformación en biomasa, productos y dióxido de carbono sólo es posible con el suficiente aporte de oxígeno desde la fase gas. Cuando, en un biorreactor, un componente poco soluble como el oxígeno, debe ser transferido desde el gas –aire– al medio líquido, donde se encuentran los microorganismos, el balance de oxígeno puede expresarse como (Moo-Young y Blanch, 1987):

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a_V \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) - q_{O_2} \cdot C_X \quad [1.60]$$

Siendo, el primer sumando a la derecha de la expresión, el término referido al transporte de oxígeno y el segundo sumando, el referido al consumo del oxígeno por parte del microorganismo.

Se han desarrollado un gran número de técnicas experimentales de medida, con distintas variantes, todas ellas aplicables dentro de un intervalo restringido de condiciones de operación y que se pueden clasificar en: técnicas de medida indirecta y técnicas de medida directa.

Las técnicas de medida indirecta son aquellas que se llevan a cabo en sistemas donde no se está produciendo una biotransformación. Los valores de $k_L a_V$ obtenidos en medios artificiales que simulan los caldos de fermentación se emplean, generalmente, para realizar comparaciones entre diferentes biorreactores que operan en condiciones similares o en la obtención de correlaciones empíricas que permitan estimar el coeficiente de transporte y poder describir la transferencia de materia gas-líquido (Dussap y col., 1985; Vlaev y Valeva, 1990; Yasukawa y col., 1991a; Leckie y col., 1991b; García-Ochoa y Gómez, 1988).

En estos casos, en ausencia de transformación microbiana, el término correspondiente al consumo de oxígeno, $q_{O_2} \cdot C_X$, de la ecuación [1.60] es cero, resultando la siguiente ecuación:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = k_L a_V \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) \quad [1.61]$$

Los datos experimentales para la resolución de esta ecuación se pueden obtener mediante diferentes técnicas o métodos, que pueden ser clasificados en químicos y físicos. Los métodos químicos, se basan en la medida de la concentración de oxígeno disuelto a través de una reacción química tal como la oxidación del sulfito (Yoshida y col., 1960; Dussap y col., 1985; Yang y col., 1992), la adsorción de CO₂ (Danckwerts y Gillham, 1966; Danckwerts, 1970) o la oxidación de la hidracina (Onken y col., 1985). Los métodos físicos utilizan la respuesta de un electrodo de oxígeno, a los cambios en la concentración de este gas en el medio, en condiciones no estacionarias o dinámicas. Este último tipo de método es el más ampliamente utilizado y se basa en la medida de la concentración del oxígeno disuelto durante la absorción o desorción de oxígeno de la disolución (Dussap y col., 1985; Costa y col., 1982a y 1982b; Merchuk y col., 1994; Arranz, 1993; Gómez, 1995, García-Ochoa y Gómez, 1998). Su aplicación presenta ciertas restricciones que es necesario tener en cuenta para la obtención de valores correctos, como son la adecuada disposición en el reactor del electrodo de medida del oxígeno disuelto, el tiempo de respuesta y la linealidad del mismo (Nocentini y col., 1993; Merchuk y col., 1994).

Las técnicas de medida directa son aquellas en las que se determina la velocidad de transferencia de materia en presencia de microorganismos, es decir, en la fermentación real por lo que el valor obtenido es más representativo del sistema en estudio. La medida de la variación de la concentración de oxígeno en el biorreactor puede realizarse en condiciones estacionarias o no estacionarias o dinámicas.

La técnica directa más utilizada por su sencillez y relativa exactitud es la técnica dinámica (Dussap y Gros, 1985; Yang y col., 1988; Gao y Lee, 1992; Rane y Sims, 1994; Gómez, 1995). Este método se basa en el balance de oxígeno disuelto en el biorreactor, expresado en la ecuación [1.60], midiendo la evolución de la concentración del oxígeno disuelto durante la interrupción de la aireación del caldo y su posterior aireación. Si a su vez, se mide la concentración celular del medio de cultivo se puede determinar el consumo específico de microorganismo, q_{O_2} .

En la Figura 1.13 se recoge, de forma esquemática, las distintas fases de aplicación de este método. En una primera fase, se suspende la aireación del medio de cultivo, registrando el decrecimiento de la concentración del oxígeno disuelto con el tiempo, de forma que la ecuación [1.60], en estas condiciones, se reduce a:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = -q_{O_2} \cdot C_X \quad [1.62]$$

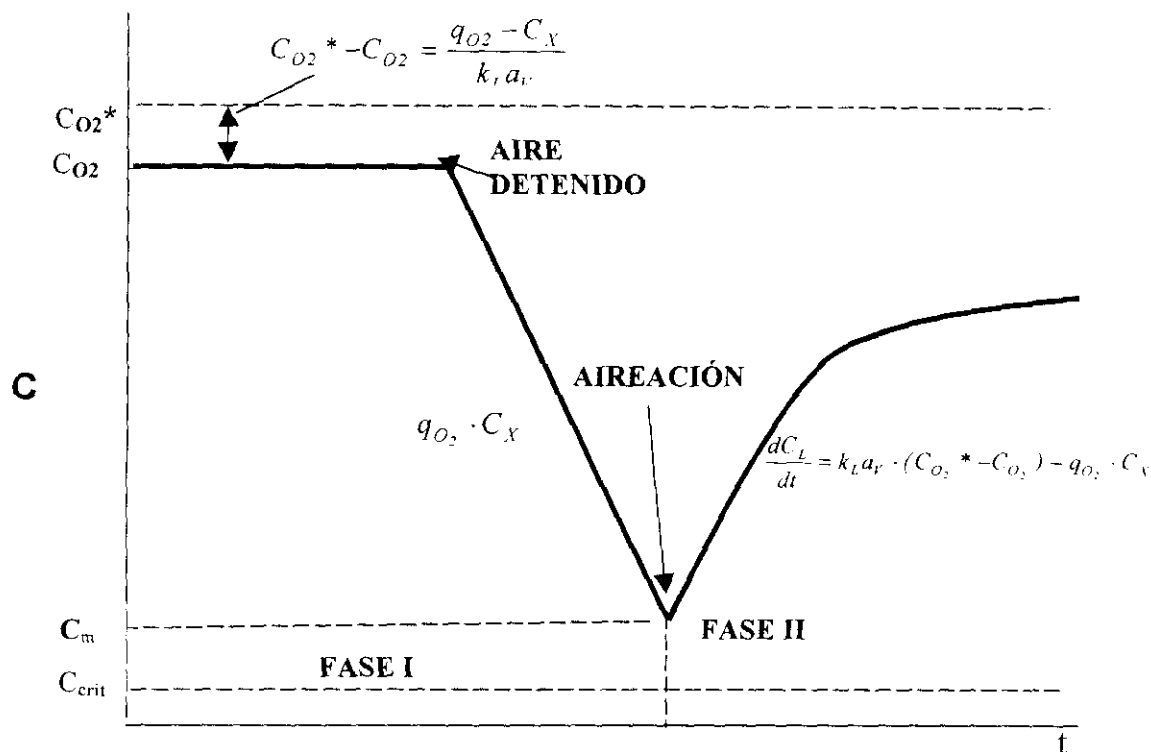


Figura 1.13.- Esquema de la técnica dinámica (régimen no estacionario) para la medida del coeficiente de transferencia de materia.

Antes de que la concentración de oxígeno disuelto alcance un valor crítico, se reanuda la aireación del medio de cultivo y se registra la variación de la concentración de oxígeno disuelto con el tiempo. En estas condiciones, la ecuación [1.60] se puede expresar como:

$$dC_{O_2} = k_L a_v \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) \cdot dt - q_{O_2} \cdot C_X \cdot dt \quad [1.63]$$

Teniendo en cuenta que, en el momento que se inicia la aireación del caldo de fermentación, las condiciones iniciales son $t = t_m$ y $C = C_m$, la ecuación [1.63] se puede integrar, obteniéndose la siguiente expresión:

$$q_{O_2} \cdot C_X \cdot (t - t_m) + (C_{O_2} - C_m) = k_L a_V \int_{C_m}^C (C_{O_2}^* - C_{O_2}) \cdot dt \quad [1.64]$$

ecuación, que una vez integrada, permite calcular el valor de $k_L a_V$ a partir de la variación de la concentración de oxígeno con el tiempo, una vez conocido el valor del consumo del microorganismo, $q_{O_2} \cdot C_X$, de la pendiente de la primera parte de la curva.

La transferencia de oxígeno en un biorreactor tipo tanque agitado -el más ampliamente utilizado en este tipo de procesos- es función de numerosas variables, tales como las propiedades físicas del líquido (viscosidad, tensión superficial, etc.), la geometría del tanque y del agitador, el tipo de difusor empleado y las condiciones de operación.

Este elevado número de variables hace que existan numerosas correlaciones empíricas para predecir el valor de $k_L a_V$ que podemos clasificar en dos categorías. Unas tienen una forma dimensional, correlacionando $k_L a_V$ con la velocidad de agitación (o potencia por unidad de volumen, la velocidad superficial del gas y, en caso de que el fluido sea no-Newtoniano, con la viscosidad. Según una expresión del tipo:

$$k_L a_V = C_1 \cdot V_S^\alpha \cdot N \cdot \mu_a^\gamma \quad [1.65]$$

o bien, si se utiliza la potencia suministrada por el agitador:

$$k_L a_V = C_2 \cdot V_S^\alpha \cdot \left(\frac{P}{V}\right)^\beta \cdot \mu_a^\gamma \quad [1.66]$$

Los valores de las constantes, C_1 y C_2 , y de los exponentes en ambos tipos de ecuaciones cambian para los distintos autores, dependiendo, principalmente, de los parámetros geométricos del tanque. En la Tabla 1.7 se presentan los valores de los exponentes de cada una de las variables en algunas de las correlaciones propuestas en la literatura.

La segunda categoría, tiene una forma adimensional y expresan, generalmente, el número de Sherwood como una función del número de Reynolds, Aireación y Weber.

$$Sh = C \cdot Re^{X_1} \cdot Na^{X_2} \cdot We^{X_3} \quad [1.67]$$

Ambos tipos de ecuaciones, son únicamente aplicables, en un restringido intervalo de las condiciones de operación y son específicas de cada recipiente.

Tabla 1.7.- Valores de los exponentes encontrados por distintos autores en correlaciones dimensionales.

FLUIDO	Autores	N	P/V	V _s	T	μ_{eff}	μ_c
NEWTONIANOS	Yagi y Yoshida (1975)	2,2	-	0,3	-	-0,4	-
	Figueiredo y Calderbank (1979)	-	0,6	0,8	1,0	-	-
	Nishikawa y col. (1981)	-	0,8	0,3	-	-	-
	Moo-Young y Blanch (1987)	-	0,4	0,5	-	-	-
	Ogut y Hatch (1988)	0,9	-	0,7	0,5	-	-
	Poizat y co. (1992)	2,7	-	0,6	-	-	-
	Nocentini y col. (1993)	-	0,6	0,4	-	-1,2	-
	Roman y col. (1993)	0,5	0,4	0,5	-	-	-
	Linek y col (1994)	-	0,7	0,4	-	-	-
	Pedersen y col. (1994)	2,0	-	0,5	-	-	-
NO-NEWTONIANOS	Nishikawa y col. (1981)	2,4	0,8	0,3	-2,5	-0,5	-
	Costa y col (1982)	2,0		0,4	2,5	-0,4*	-
	Dussap y col. (1985)	1,5	-	0,5"	-	-0,7	-
	Linek y Vacek (1988)	-	0,9	0,4	-	-	-
	Ogut y Hatch (1988)	0,5	-	0,5	0,1	-0,4	-
		-	0,02	0,9	-	-0,6	-
	Linek y col (1991)	-	1,1	0,4	-	-	-
	Pedersen et al. (1994)	2,7	-	0,6	-	-	-
	García -Ochoa y Gómez. (1998)	2,0	-	0,67	-	-0,67	-1,0
	García-Ochoa y Gómez (1998)	-	0,6	0,67	-	-0,67	-1,0

En un trabajo previo, llevado a cabo por este equipo de investigación, se realizó un amplio estudio de la transferencia de oxígeno en este proceso, determinándose k_L tanto en disoluciones de xantano como en caldos de fermentación, durante la biotransformación, en un amplio intervalo de condiciones de operación y geometrías de tanque (Gómez, 1995). En ambos casos, se empleó una técnica dinámica.

En el caso de disoluciones de xantano y para un biorreactor de 25 litros, cuando la reología se describe mediante el modelo de Ostwald-de Waele, se obtuvo la siguiente ecuación:

$$k_L a_V = C_I \cdot V_S^{2/3} \cdot N^2 \cdot \mu_{ef}^{-2/3} \quad [1.68]$$

y para uno de 2 litros:

$$k_L a_V = C_I \cdot V_S^{1/2} \cdot N^1 \cdot \mu_{ef}^{-2/3} \quad [1.69]$$

El exponente de la viscosidad cambia cuando la viscosidad se describe mediante el modelo reológico de Casson, tomando un valor de -1 .

Los valores obtenidos son acordes con los propuestos en la bibliografía. En la Figura 1.14 se comparan los valores obtenidos a partir de la ecuación [1.69] con las correlaciones propuestas por otros autores para sistemas análogos y en el mismo intervalo de condiciones de operación. En la misma se observa, que los valores obtenidos por Ogut y Hatch (1988) son significativamente superiores al resto de los trabajos, siendo las diferencias tanto más significativas cuanto menor es la velocidad de agitación. La presencia de electrólitos y la aplicación de una técnica poco adecuada (el método químico del sulfito) que proporciona valores muy superiores, no comparables a los obtenidos mediante métodos físicos. Las diferencias obtenidas por otros autores y las calculadas con la ecuación [1.69] se explican por el efecto de los parámetros geométricos sobre el coeficiente de transporte en el biorreactor usado en el estudio (altura, tipo de agitador, tipo de difusor, etc.) y las propiedades físicas del fluido.

Asimismo, en presencia del microorganismo *Xanthomonas campestris*, la correlación entre las variables de operación que influyen en el sistema y el coeficiente de transporte, en un biorreactor de 2 litros es:

$$k_L a_V = 3,08 \cdot 10^{-4} \cdot V_S^{0,43} \cdot N^{1,75} \cdot \mu_a^{-0,39} \quad [1.70]$$

Como puede observarse, la influencia, sobre el coeficiente volumétrico de transferencia de materia, de la velocidad superficial del gas es similar; mientras que la velocidad de agitación es mayor y la influencia de la viscosidad aparente, menor. Así mismo, los resultados experimentales obtenidos muestran que los valores del coeficiente de transporte son superiores en presencia de microorganismo que cuando se realiza en ausencia de transformación microbiana. Por ello, en el resto del trabajo se utilizará esta última ecuación para la determinación del coeficiente de transporte, en su aplicación a los modelos cinéticos.

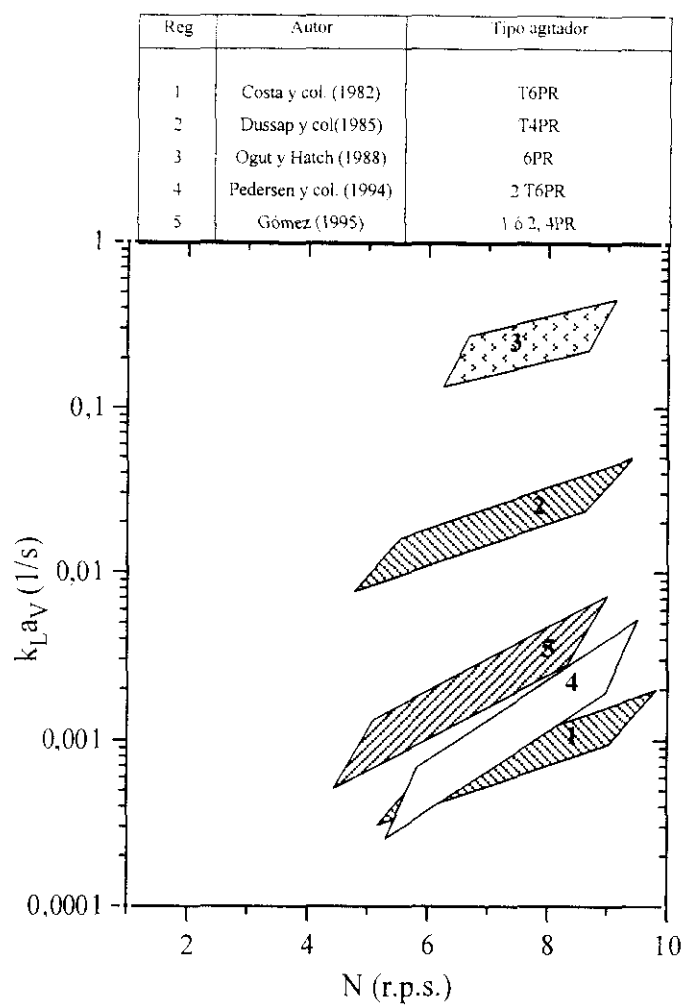


Figura 1.14.- Predicción de diferentes correlaciones adimensionales para valores de $k_L a_V$, obtenidos por diferentes autores. $V_s=0,002$ m/s; $\mu_{ef}= 8.10^{-3}$ a 30.10^{-3} Pas.

1.3.4.- Aislamiento y Purificación

Una vez obtenido el xantano, queda bastante diluido en el caldo de fermentación, y se encuentra mezclado con una gran variedad de otros compuestos –componentes del medio utilizado que no ha empleado el microorganismo (sales y nutrientes), las propias células, etc.-. La composición media de un caldo resultante de una fermentación para realizar la producción de xantano es, aproximadamente, la siguiente de: 1 a 4% de xantano, de 0,2 a 0,5% de células y de 0,1 a 1% de sales y azúcares no consumidos. Además, debido a la presencia de xantano, el medio es muy viscoso, unos 100 Kg/m.s. Por todo ello, la recuperación del xantano del caldo de fermentación no es sencilla, ya que se debe de

eliminar cerca del 95% del caldo. Para conseguir este fin se pueden emplear tanto métodos físicos como químicos (Kennedy y Bradshaw, 1984), dentro de los que se encuentran:

- Tratamientos preliminares, enfocados a la degradación y eliminación de las células.
- Precipitación del polisacárido.
- Etapas finales, como son lavado, secado, molienda y empaquetado.

En la literatura se han propuesto y empleado diferentes técnicas para llevar a cabo este proceso. Así, los tratamientos preliminares empleados son de naturaleza térmica (Smith, 1983; Inkson y Wilkinson, 1981), química (Inkson y Wilkinson, 1981; Patton y Holman, 1968) y/o física (Patton y Holman, 1968; Bouinot, 1976; Towle, 1977; Inkson y Wilkinson, 1981).

En cuanto a la etapa de precipitación, ésta se puede llevar a cabo disminuyendo la solubilidad de la goma por adición de alcoholes o cetonas de bajo peso molecular, tales como metanol (Smith, 1983), etanol e isopropanol (Smith, 1983; Inkson, 1979; Bouinot, 1976), t-butanol (Bouinot, 1976), acetona (Smith, 1983), etc. En la mayoría de los trabajos, el disolvente empleado es isopropanol (Smith, 1983; Inkson y Wilkinson, 1981; Bouinot, 1976), en cantidades referidas a volumen de caldo entre 1,8:1 y 2,5:1 (v IPA/v caldo).

Otros autores (Patton y Holman., 1968; Pace y Righelato, 1981; Albretch y col., 1964; Kenedy y col., 1981) han propuesto la adición de cationes polivalentes a las soluciones de xantano, realizándose la precipitación del xantano debido al carácter polielectrolítico del polisacárido. Se puede realizar la precipitación por la adición de sales de calcio (Patton y Holman, 1968; Macneely y O'Connell, 1966) a pH básico (entre 8,5 y 12) o por sales de aluminio (Albretch y col., 1962 a pH ácido (entre 4 y 4,5). De este modo se obtiene una sal de xantano insoluble, que debe de ser transformado en un compuesto soluble, en forma de sal sódica o potásica, para su empleo comercial.

Otra posibilidad es el empleo combinado de ambos efectos (debido al disolvente y a la presencia de cationes en la disolución). Smith (1983) señaló la posibilidad de añadir al caldo sales –de calcio, magnesio y cinc- así como isopropanol, disminuyendo en gran manera la cantidad de disolvente necesaria para llevar a cabo la precipitación. El empleo de sales polivalentes se debe a que, cuanto mayor es la carga del catión empleado, menor es el volumen necesario de disolvente para conseguir la precipitación de la misma cantidad de xantano (ver Figura 1.15).

Las etapas finales empleadas dependen de las propiedades comerciales y los usos a los que se vaya a dedicar el xantano purificado.

Fernández (1992) propuso un método para realizar el citado proceso de aislamiento y purificación del xantano, dentro de las especificaciones exigidas para su comercialización. Este procedimiento consiste en diluir el caldo de fermentación con alcohol. La adición del alcohol cumple una doble misión, por un lado la dilución de los caldos, provocando una notable disminución en su viscosidad, y por otro actuar como un biocida, destruyendo la actividad bacteriana, así como, en muchos casos, su pared celular. Una vez diluidos, los caldos se filtran, separando así las células del medio.

El xantano se separa del medio por precipitación al adicionar más cantidad de alcohol o alcohol y sales, siendo el alcohol isopropílico el más adecuado ya que generaba un menor coste en disolventes, pues aunque cantidades similares de acetona produce la misma separación, tanto por la cantidad requerida como, sobre todo, por su menor toxicidad, es preferible el empleo de IPA, como puede apreciarse en la Figura 1.15. Además, este comportamiento es bastante parecido a distintas concentraciones de xantano en disolución.

La adición de sales al medio hace reducir notablemente la cantidad de alcohol necesaria para la precipitación del xantano, aunque hay una gran diferencia entre utilizar sales monovalentes, divalentes o trivalentes, cuanto mayor es la carga del catión, menor es la cantidad de alcohol necesaria para obtener la precipitación del xantano (Figura 1.15). El aumento de la concentración de sales en el medio reduce, también, la cantidad de alcohol necesaria para la precipitación (García-Ochoa y col., 1993). En la Figura 1.16 se observa la influencia de la concentración de sales empleada sobre el volumen de IPA necesario para la precipitación del xantano. Las sales de cationes monovalentes pueden ser las elegidas para

realizar el proceso, ya que evitan la etapa posterior de conseguir que la sal de xantano insoluble, obtenida en el caso de emplear sales de cationes polivalentes sea transformada en soluble por cambio del catión.

Cuando el xantano es separado del caldo se le somete a sucesivos lavados con alcohol o con diversas mezclas alcohol-agua. De esta forma se eliminan las sales que haya podido arrastrar en el proceso, tratando de evitar la redisolución de parte del xantano.

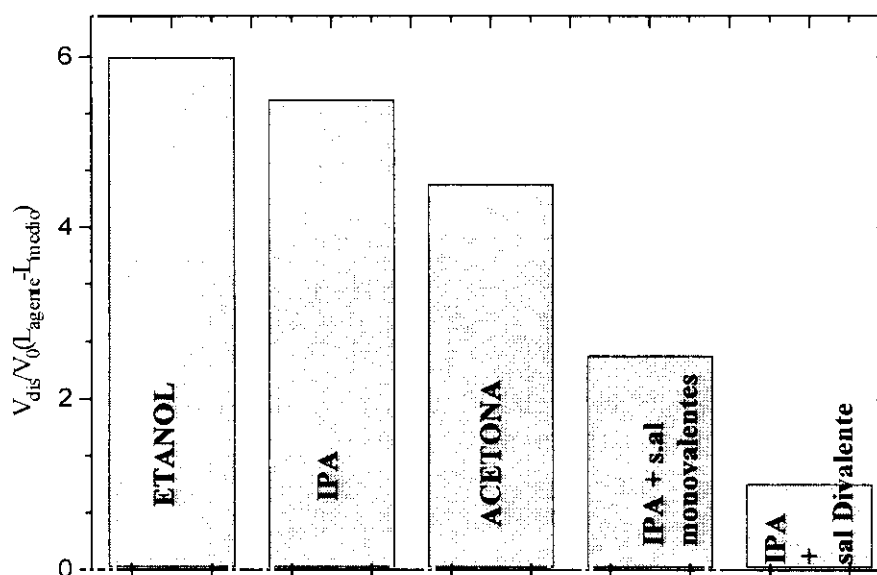


Figura 1.15.- Utilización de diferentes agentes para la precipitación del xantano.

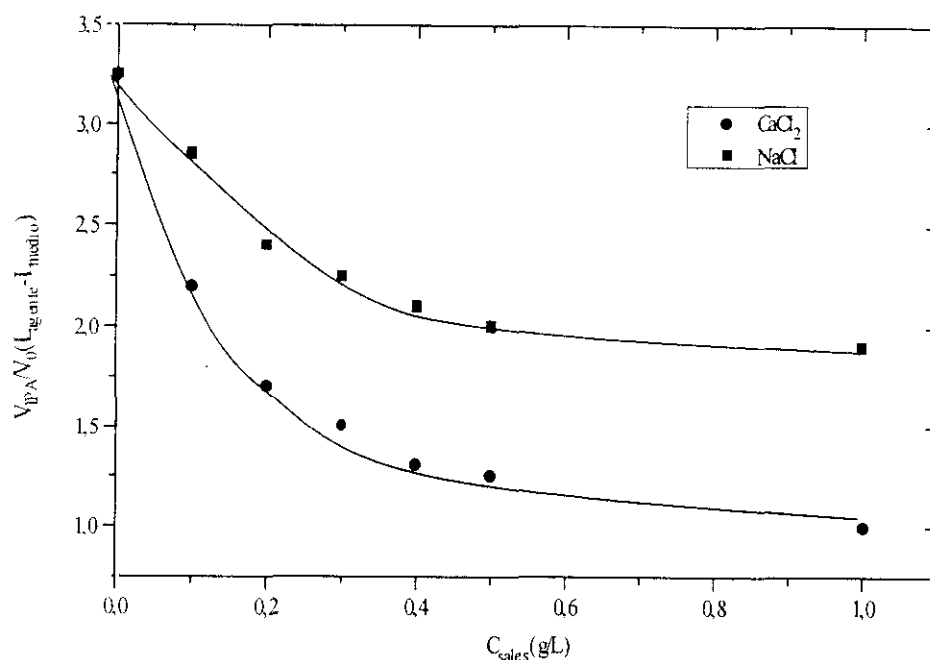


Figura 1.16.- Influencia de la adición de sales sobre un volumen de IPA para la precipitación total de xantano

1.3.5.- Propiedades del Xantano

Las propiedades y características exigidas al xantano, que deben cumplir las especificaciones comerciales son las siguientes:

- Contenido en cenizas y humedad.
- Contenido en nitrógeno, acetato y piruvato.
- Viscosidad (como indicación del peso molecular) y comportamiento reológico.

Debido a que la propiedad más característica del xantano es la **elevada viscosidad** en disoluciones acuosas se han realizado diversos estudios de esta propiedad. En un trabajo previo (Casas, 1991), se estudió el comportamiento reológico empleando un viscosímetro de cilindros concéntricos, marca Brookfield, modelo LVT-Sinchroelectric, ampliamente empleado en la industria y en la literatura para determinar la viscosidad de los caldos de

fermentación. La naturaleza polielectrolítica del xantano obliga a estabilizar su conformación en disolución, por adición de pequeñas cantidades de sal (generalmente NaCl), siendo esta la única forma de obtener resultados reproducibles y evitar así posibles comportamientos tixotrópicos o de agregación de moléculas.

Las disoluciones de xantano presentan un comportamiento claramente pseudoplástico, aumentando extraordinariamente la viscosidad al aumentar la concentración en disolución, como se aprecia en la Figura 1.17. La viscosidad se ve poco afectada, pero disminuye algo, al aumentar la temperatura de medida, como pone de manifiesto la Figura 1.18, y varía de una forma poco habitual con el cambio de la temperatura de disolución, según se aprecia en la Figura 1.19. Esta extraña influencia de la temperatura de disolución en la viscosidad se debe a un cambio en la conformación de la molécula de xantano en disolución, lo que se denomina estructura terciaria. La conformación que adquiere el xantano depende de la temperatura a la que se realiza la solubilización, pudiendo adquirir una conformación ordenada (doble hélice, a temperaturas de disolución comprendidas entre 25 y 40° C) o una conformación desordenada (de ovillo, para temperaturas de disolución más elevadas, 60-80° C). El cambio conformacional se observó por medidas tanto de rotación óptica como de dicroísmo circular. Este cambio en la molécula de xantano en disolución no fue relacionado claramente con la variación de la viscosidad, y se estableció claramente la diferencia entre la variación de la temperatura de disolución y la de medida, aunque en otros trabajos no se indica si el cambio conformacional se produce con una variación de la temperatura de medida —o a la que se utiliza—, siendo independiente de la temperatura a la que la molécula se ha disuelto.

En el trabajo previo citado se determinó la viscosidad de las disoluciones de xantano, en distintas condiciones de concentración de xantano, temperatura de disolución y temperatura de medida, y se ha correlacionando utilizando distintos modelos, como los que aparecen en la Tabla 1.10. Los citados modelos reproducían de forma satisfactoria los resultados experimentales que obtuvieron los autores. Aunque todos ajustaban bien los datos experimentales parece observarse una menor dispersión en la reproducción de datos al utilizar el modelo de Casson; esta diferencia es más notoria cuanto mayores sean los valores de viscosidad. En el ajuste con el modelo de Horschel-Bulkley se obtienen valores para τ_0 (esfuerzo cortante aparente) muy próximos a cero, lo que hace que este modelo se reduzca al de Ostwald- de Waele.

Tabla 1.10.- Modelos reológicos para disoluciones acuosas de xantano.

MODELO	FUNCION
Ostwald- de Waele	$\tau = k \cdot \gamma^n (\mu_a = k \cdot \gamma^{n-1})$
Casson	$\tau^{1/2} = \tau_0^{1/2} + k_C \cdot \gamma^{1/2}$
Horschel-Bulkley	$\tau = \tau_0 + k_{HB} \cdot \gamma^n$

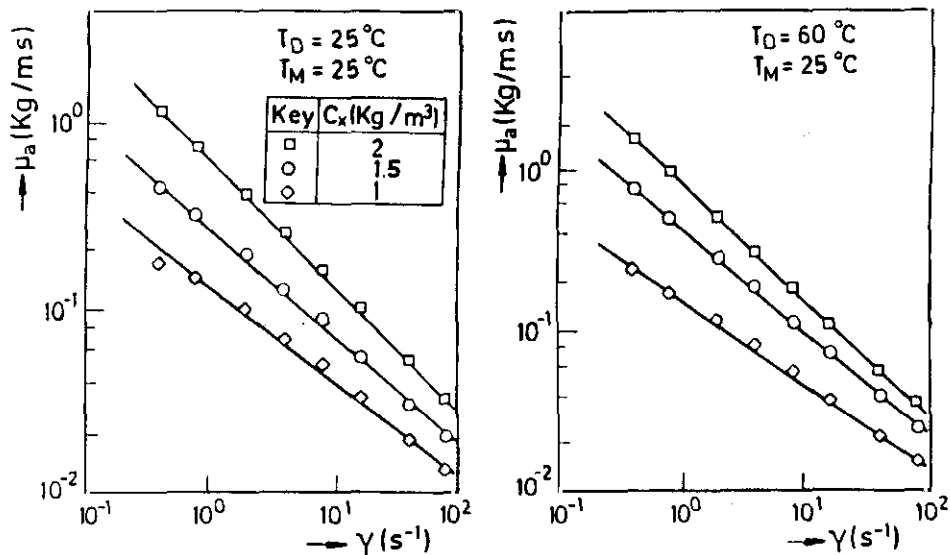


Figura 1.16.- Comportamiento pseudoplástico de las disoluciones de xantano.
Influencia de la concentración del polisacárido.

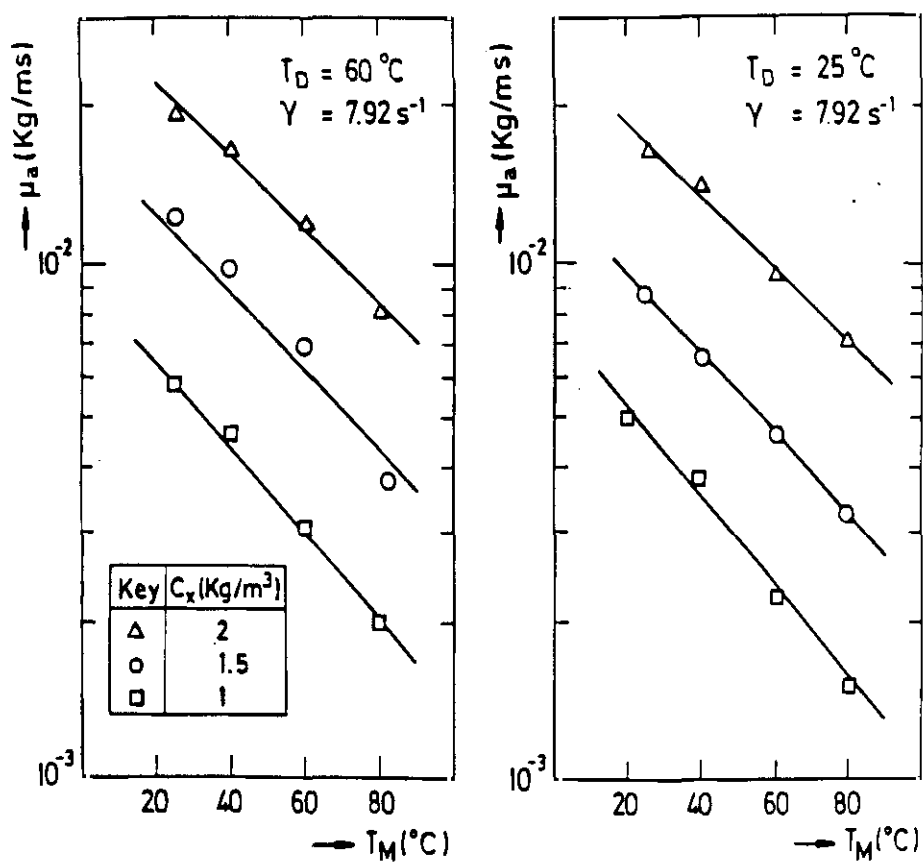


Figura 1.17.- Influencia de la temperatura de medida en la viscosidad de disoluciones de xantano.

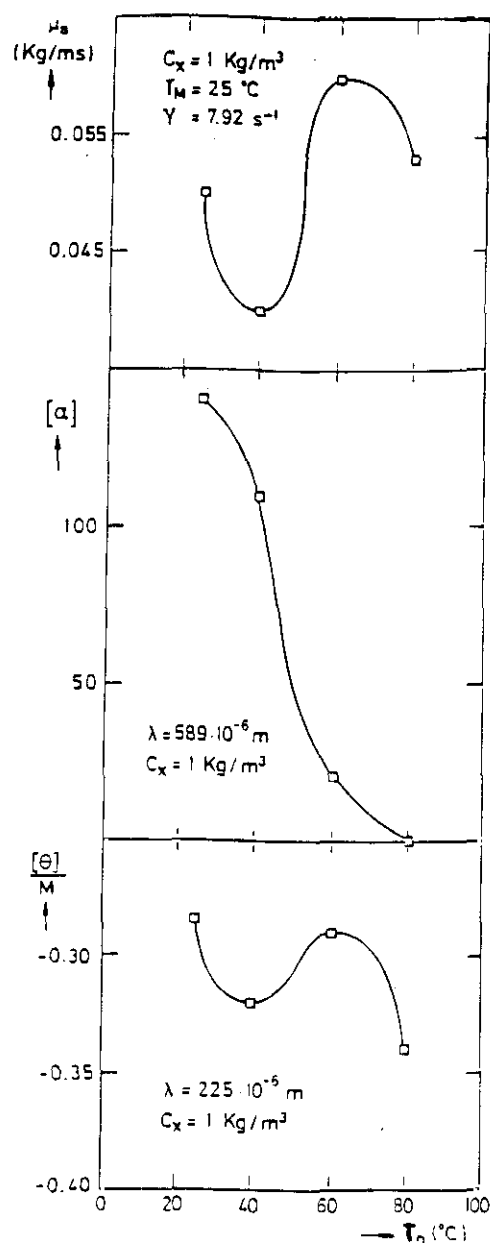


Figura 1.18.- Cambio conformacional en la molécula de xantano. Variación de la viscosidad, ángulo de rotación óptica y dicroísmo circular con la temperatura de disolución

La reología del xantano cambia con la naturaleza del polímero, es decir, depende de su peso molecular y del nivel de acetilación de la molécula (Tako y Nakamura, 1984) y del grado de piruvatización (Peters y col., 1993; Kang y Pettit, 1993). Estos niveles en el contenido de acetato y piruvato varían con las condiciones en las que crece la bacteria (Souw y Demain, 1979; Cadmus y col., 1978; De Vuyst y col., 1987), con las condiciones

de operación (Trilsbach y col., 1984; Peters y col., 1993) y con la especie de *Xanthomonas* sp empleada (Cadmus y col., 1976; Kennedy y Bradshaw, 1984; Tait y col., 1986).

Un xantano con un nivel alto de acetato y, especialmente, de piruvato, aumenta la viscosidad de las disoluciones acuosas al favorecer las asociaciones intermoleculares (Tako y Nakamura, 1984).

Existen numerosos trabajos que abordan el estudio de las condiciones de operación en la estructura y peso molecular. La variable más estudiada, es la influencia de las propiedades sobre el grado de piruvatización, debido a que esta variable es indicativa de la calidad del polisacárido (Cadmus y col., 1978).

En cuanto a la **influencia de la temperatura**, algunos autores (Cadmus y col., 1978; Shu y Yang, 1990) han observado la influencia de esta variable en el grado de piruvatización, llegando a obtener el máximo contenido en piruvato cuando el proceso se realizaba a 27°C. En el trabajo realizado por Casas y col. (1999), se observó que el contenido en piruvato no variaba con la temperatura de producción, pero el contenido en acetato del xantano obtenido, a bajas temperaturas 25 y 28° C era mayor que el contenido a temperaturas más altas. En cuanto al peso molecular del xantano, este es mayor a medida que disminuye la temperatura. Concluyeron que la concentración de producto obtenida era mayor cuando la temperatura de operación era de 28° C. Para un intervalo de temperatura entre 25 y 34 °C, la viscosidad de las disoluciones de xantano es mayor cuanto menor es la temperatura de producción. Los parámetros de los modelos de Ostwald-de Waele y de Casson- índice de consistencia (k_c) y esfuerzo cortante aparente (τ_0)- aumentan a medida que disminuye la temperatura del proceso de fermentación.

La **composición del medio** de producción también influye en la estructura molecular del xantano. Este aspecto ha sido estudiado teniendo en cuenta varios nutrientes, pero la mayoría de los trabajos se centran en el estudio de la fuente de nitrógeno. Hay autores que encuentran un mayor grado de piruvatización cuando la fuente de nitrógeno empleada es de naturaleza orgánica (Qadeer y Baig, 1989; Kennedy y col., 1982), pero Cadmus y col (1978) concluyen que la mejor fuente de nitrógeno para conseguir un xantano con alto contenido en piruvato es $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Sin embargo, De Vuyst y col., (1987) observaron una influencia inversa del ión $(\text{PO}_3)^{3-}$ y el grado de piruvatización. Kennedy y

col. (1982) encontraron un incremento en el contenido en piruvato cuando la concentración de nitrógeno en el medio se aumentaba, pero Davidson y col. (1978) obtuvieron mayor piruvatización y menor contenido en acetato cuando la fuente nitrogenada era el nutriente limitante. Trilsbach y col. (1984) no encontraron relación entre el contenido en piruvato de la molécula y la composición del medio. Posteriormente, Casas y col. (1999), también estudiaron la influencia de esta variable sobre las propiedades de la molécula. Así, en el trabajo realizado se muestra que la concentración de nitrógeno no afecta al contenido en piruvato y acetato ni al peso molecular del polímero. Además en su estudio se observó un máximo de producción de xantano, coincidente con la concentración de amonio optimizada por Santos (1993), por debajo o por encima de esta concentración (0,257 g/L de amonio) la concentración de xantano es menor. En lo referente a la viscosidad de las disoluciones de xantano, se observó que es mayor cuanto menor es la concentración de sustrato nitrogenado empleado en el medio de producción.

La **influencia de la concentración de oxígeno disuelto** ha sido estudiada, sobre todo en el contenido en piruvato (Cadmus y col., 1978) y en el peso molecular (Suh y col., 1987; Peters y col., 1989). Cadmus y col (1978) estudiaron el grado de piruvatización cuando el proceso se llevaba a cabo con diferentes caudales, no encontrando diferencias significativas entre caudales de 0,75 hasta 1,5 L/L/min. Peters y col. (1989) estudiaron la influencia del oxígeno disuelto sobre el peso molecular (cambiando la velocidad de agitación y empleando aire enriquecido), observaron que el peso molecular del xantano aumentaba cuando no existían limitaciones del oxígeno durante el proceso. Esta influencia también ha sido observada por Casas y col (1999) que han llevado a cabo el estudio de la influencia del oxígeno disuelto, variando la velocidad de agitación en el biorreactor, observando que la influencia de esta variable se ve reflejada en la mayor producción obtenida con el aumento de la concentración de oxígeno disuelto en el biorreactor. Cuanto mayor es la concentración de oxígeno disuelto, mayor es la viscosidad de los caldos de fermentación. El contenido en piruvato es independiente de la cantidad de oxígeno disuelto en el medio, sin embargo, se obtiene un mayor grado de acetilación cuando la producción se realiza con una agitación elevada (500 r.p.m.); por otro lado, en cuanto al peso molecular, la limitación de oxígeno disuelto da lugar a polisacáridos de menor peso molecular.

2. – PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El trabajo descrito en esta Memoria ha precisado de la utilización y puesta a punto de diversas técnicas, tanto de experimentación como de análisis; a continuación se detallan cada una de ellas, así como los equipos y el material que ha sido empleado.

2.1.- EQUIPOS

En este apartado se describen los numerosos equipos e instalaciones necesarios para llevar a cabo la experimentación realizada en este trabajo.

Para obtener los datos experimentales necesarios para modelizar la producción de xantano se han realizado experimentos en un biorreactor comercial, empleando una incubadora orbital para la preparación de los inóculos. Además de estos equipos, ha sido necesaria la utilización de otros para conseguir la esterilidad de los medios y las temperaturas programadas en el mantenimiento y crecimiento del microorganismo. También ha sido necesario utilizar y disponer de un buen número de aparatos de medida para analizar la evolución de los diferentes componentes del proceso objeto de estudio.

A continuación se dan las características principales de los equipos empleados:

• **FERMENTADOR COMERCIAL**

El proceso de fermentación con microorganismos se ha llevado a cabo en un biorreactor BIOSTAT M de tipo tanque agitado, diseñado y comercializado por BRAUN. Está constituido por un tanque de cultivo de 2 L de capacidad y con los sistemas de medida, control y regulación de pH, oxígeno disuelto, temperatura y velocidad de agitación, de acuerdo a un diseño modular e insertados en una cabina metálica. En la Figura 2.1 se muestra un esquema del biorreactor empleado, que consta de los siguientes elementos:

Reactor: está construido en borosilicato con un volumen total de 2 L y un volumen de trabajo de 1,5 L. La vasija está constituida por una doble pared de vidrio que se encuentra cubierta por una capa de acero inoxidable con tres orificios de 19 mm de diámetro y siete orificios de 6 mm de diámetro, unidas mediante un anillo de acero inoxidable, que se detalla en la Figura 2.2.

Sistema de Medida y Control de Temperatura: el fermentador BIOSTAT M lleva un controlador PID, con un alto grado de eficacia. La temperatura del medio de cultivo es medida mediante un sensor de temperatura Pt-100, a la vez que un segundo sensor mide la temperatura del fluido calefactor que circula a través de la camisa del reactor. Ambas señales son llevadas al regulador de temperatura que opera sobre el sistema mediante una resistencia de 500 W (Figura 2.3). La temperatura de operación es seleccionada y ajustada mediante un indicador digital, con una sensibilidad de 0,1° C.

Sistema de agitación y aireación: la unidad de agitación está formada por un motor de 70W de potencia máxima, que ejerce su acción sobre una varilla de acero inoxidable, sobre la que se encuentran dos agitadores de turbina de cuatro palas rectas. Este sistema garantiza una velocidad de agitación adecuada en procesos en los que se llega a alcanzar una elevada viscosidad en el caldo.

La velocidad de agitación es medida por un tacómetro, ajustable entre 0 y 1990 r.p.m., con una resolución de 10 r.p.m. El valor fijado se presenta en un indicador digital y es regulado mediante un controlador PI.

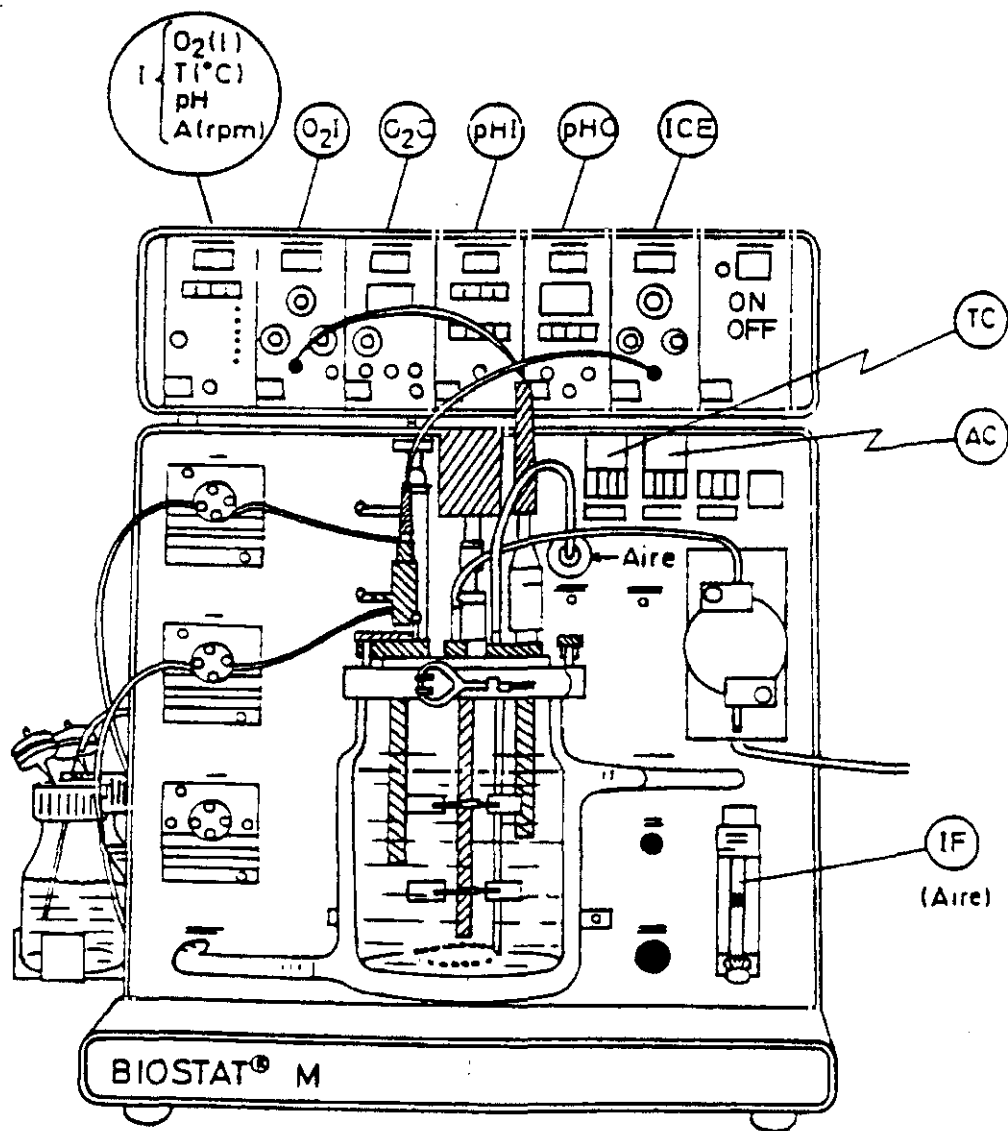
La aireación del caldo se consigue suministrando aire mediante un compresor, filtrándose a través de un filtro que posee una membrana de 0,2 μm , para conseguir la esterilización del aire que se introduce en el reactor. El aire se distribuye en el interior mediante un difusor toroidal. El caudal de aire es ajustado mediante una válvula y medido por un rotámetro.

Sistema de medida y control de oxígeno disuelto: La medida del oxígeno disuelto es realizada empleando un electrodo esterilizable, fabricado por INGOLD. Este electrodo funciona mediante el principio de polarización y consta de un ánodo de plata y cátodo de platino separados de la disolución a medir por una membrana de teflón.

La señal de medida es amplificada y convertida en una señal digital. La concentración de oxígeno disuelto puede ser controlada mediante la acción sobre el caudal de aire o bien mediante la velocidad de agitación. En la Figura 2.4 se presenta un esquema del sistema de control de oxígeno disuelto.

Sistema de medida y control de pH: El pH del medio de cultivo es analizado en línea mediante un electrodo esterilizable fabricado por INGOLD. Opera en un rango de medida de 2 a 12 unidades de pH, disponiendo de una compensación manual o automática de temperatura. La señal de medida, previamente amplificada, es alimentada a un controlador de tipo PI. Una vez fijado el valor de pH al que se desea trabajar es mantenido por la acción del controlador sobre sendas bombas de alimentación de álcali o ácido, como se muestra en la Figura 2.5.

Sistema de medida y control de Espuma: la aparición de excesiva espuma es combatida mediante la introducción de un compuesto antiespumante. Para la detección de espuma se utiliza un simple sensor de contacto, donde la parte metálica del reactor actúa como tierra. La señal de salida del sensor es enviada al módulo de control de espuma que actúa sobre la bomba de dosificación de antiespumante. El tiempo de respuesta del controlador puede ser ajustado mediante un potenciómetro. En la Figura 2.6 se muestra un esquema del sistema de medida y control de espuma.



Fermentador comercial de 2 l.

Figura 2.1.- Esquema del Fermentador Braun modelo BIOSTAT M.

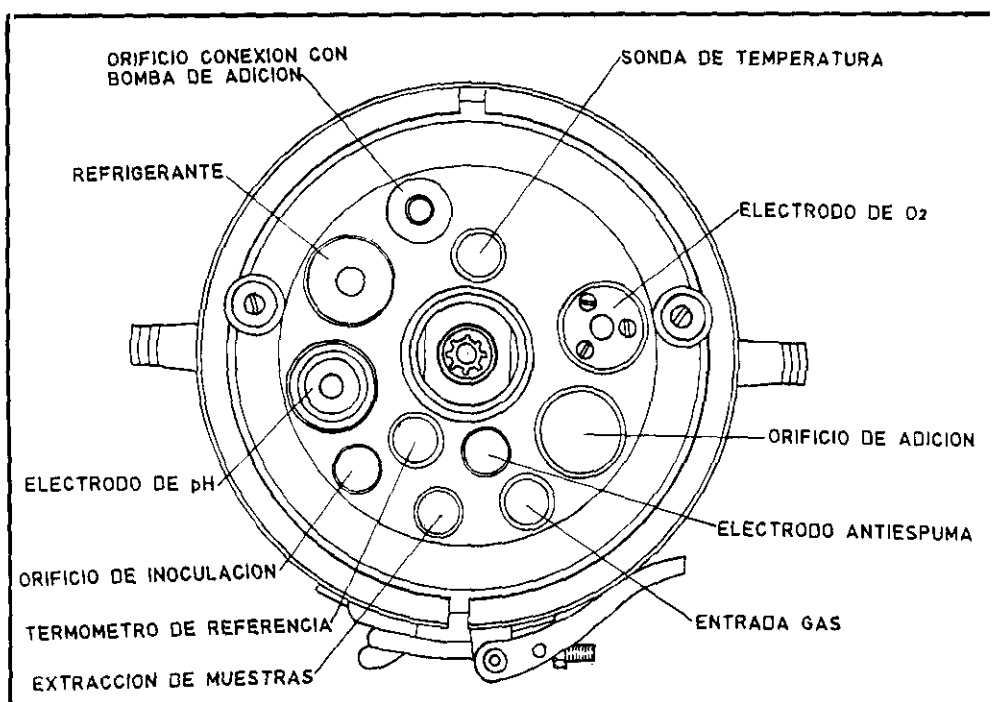


Figura 2.2.- Alzado de la vasija de fermentación.

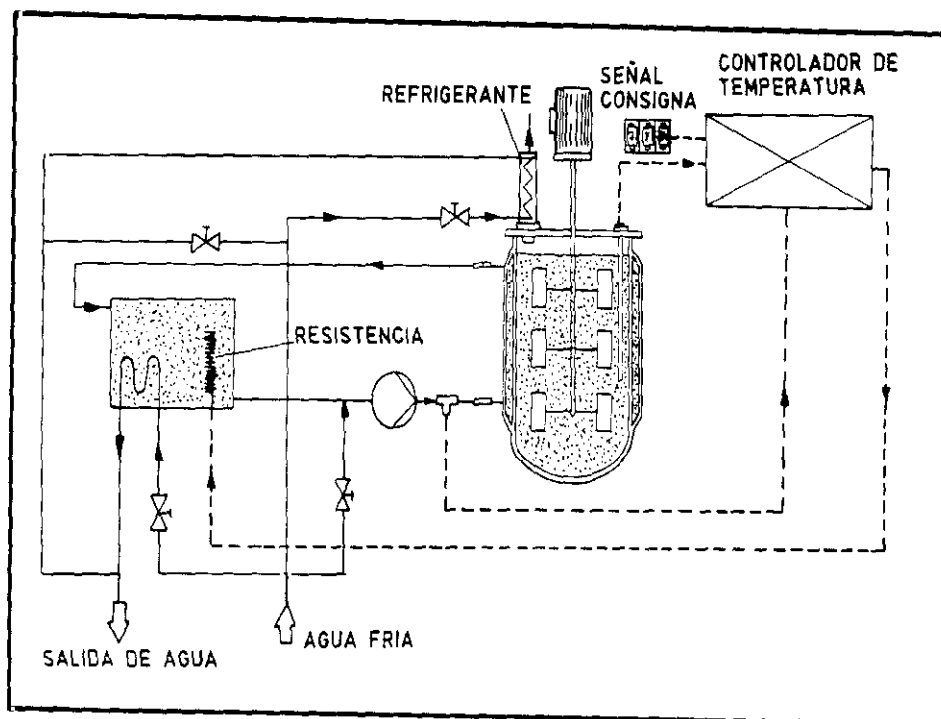


Figura 2.3.- Esquema del sistema de medida y control de temperatura.

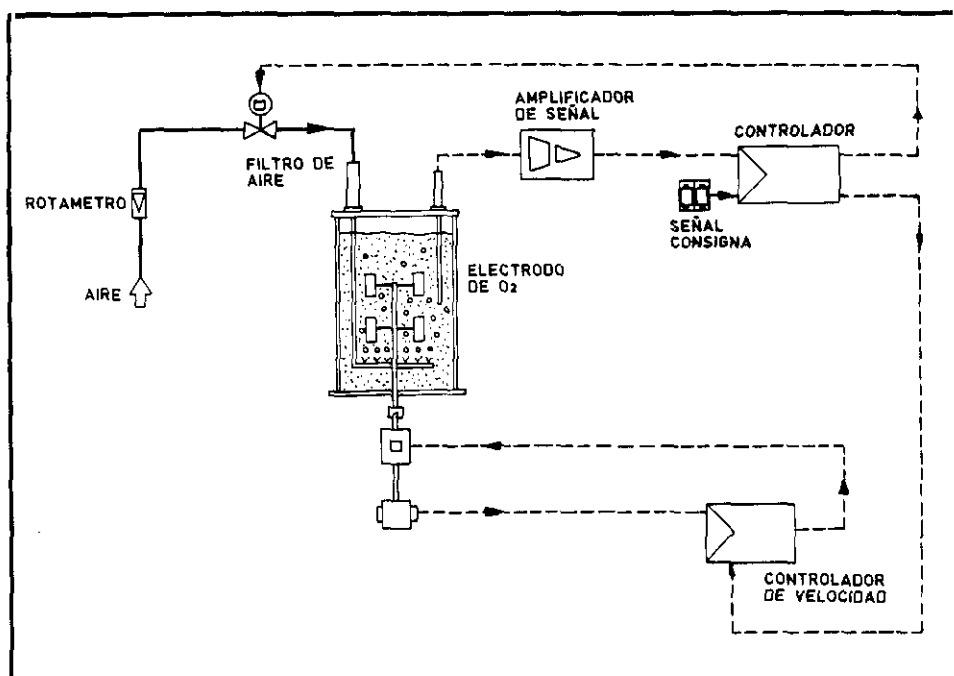


Figura 2.4.- Esquema del sistema de medida y control de oxígeno disuelto.

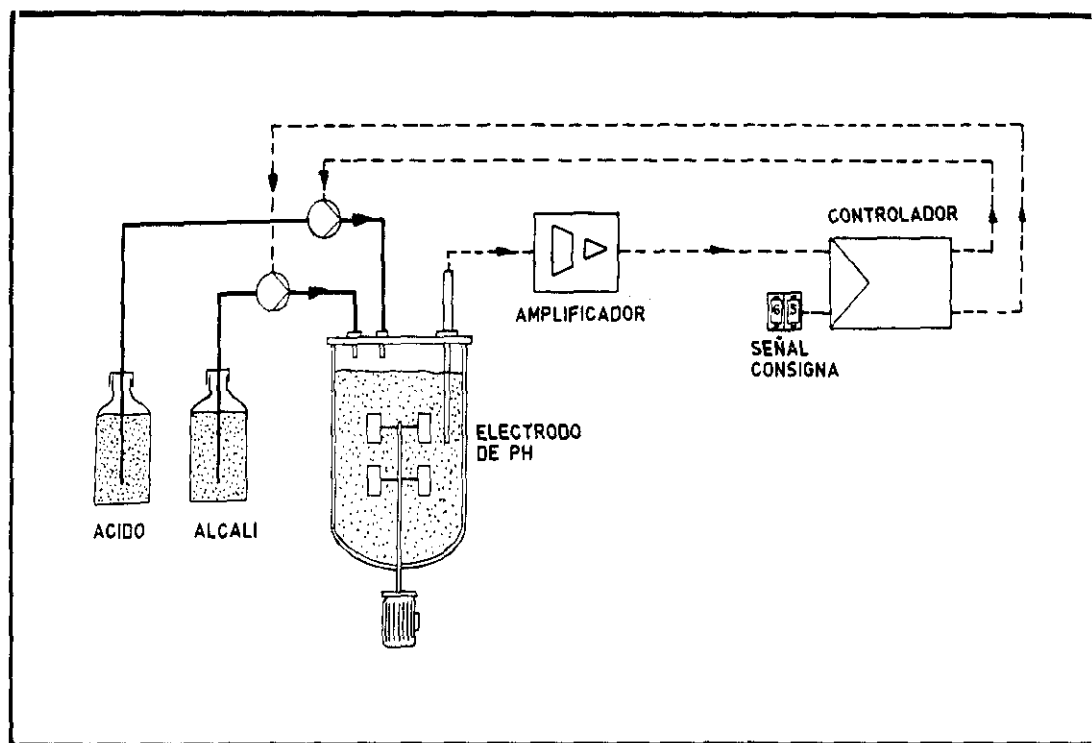


Figura 2.5.- Esquema del sistema de medida y control del pH.

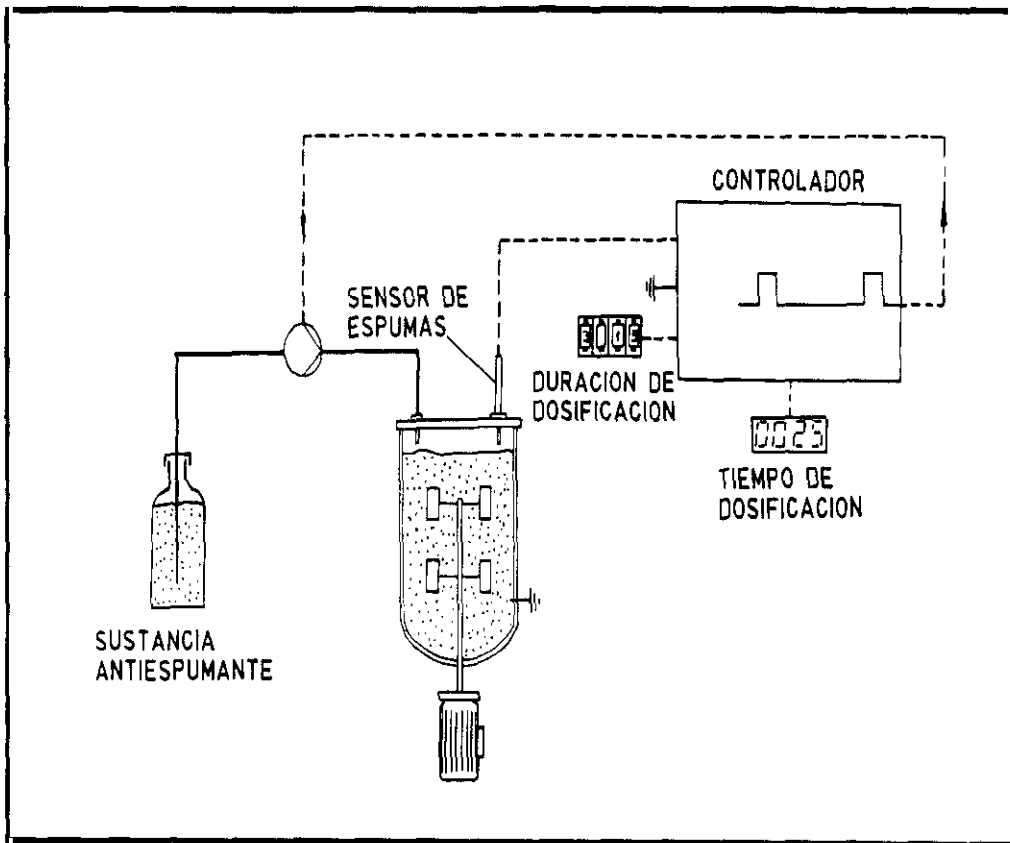


Figura 2.6.- Esquema del sistema de control y medida de espuma.

• **INCUBADORA ORBITAL**

Para el crecimiento de los microorganismos durante la preparación de los inóculos en matraces Erlenmeyers se ha empleado una incubadora orbital GALLENKAMP modelo INR-200. Con las siguientes características:

Rango de temperatura: de +5 °C a 70 °C.

Variación máxima de temperatura: $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Fluctuación de temperatura interna: $0,1^{\circ}\text{C}$.

Rango de velocidad de agitación: de 40 a 400 r.p.m. y con un radio orbital de 32 mm.

Capacidad: 30 Erlenmeyers de 250 ml o número equivalente de otro tamaño, con cambio de plataforma.

• **ESTUFA DE CULTIVO**

La estufa bacteriológica empleada de la marca SELECTA, modelo 2000207, es de convección natural. Posee una homogeneidad de $\pm 2,5\%$ y una estabilidad de $\pm 0,5\%$, pudiendo regular la temperatura desde la ambiental + 5 °C hasta 60°C.

• **CÁMARA DE FLUJO**

Para la manipulación de microorganismos en condiciones estériles se ha trabajado en una cámara de flujo laminar vertical de la firma TELSTAR modelo MICRO-V, capaz de desarrollar una velocidad de impulsión de 0,45 m/s.

• **ESTUFA DE SECADO Y ESTERILIZACIÓN**

Esta estufa es de la firma SELECTA, modelo S-202, con termómetro de referencia, termostato de regulación de la temperatura y termostato de seguridad.

• **BALANZA DE PRECISIÓN**

Para la cuantificación del peso de los diferentes compuestos empleados se ha utilizado una balanza digital marca SARTORIUS, modelo Handy. Esta balanza permite obtener pesadas del orden de miligramos con una fiabilidad de $\pm 0,1$ mg.

• **CENTRÍFUGAS**

Para la centrifugación de las muestras se han empleado dos tipos de centrífugas, una de la firma HERMLE, modelo Z 230, con capacidad para ocho tubos de 10 ml cada uno; alcanza un máximo de 5000 r.p.m.- lo que corresponde a 2000 g- durante un tiempo controlado de hasta una hora.

Para la preparación de las muestras para citometría de flujo, la centrífuga empleada fue de la marca SELECTA, modelo Centrolit con una capacidad para 30 Eppendorf, alcanza una velocidad fija de 10000 r.p.m. (18000 g) durante un tiempo que puede ser programado.

• **pHMETRO**

La medida del pH de las muestras se ha realizado con un pHmetro de la marca CRISON, modelo MICROPH 2002. Tiene una resolución de 10^{-3} y lleva incorporada una sonda CAT de temperatura, por lo que es capaz de realizar la corrección automática de la lectura del pH ante un cambio de temperatura.

• **VISCOSÍMETRO**

Para la medida de la viscosidad se ha empleado un viscosímetro BROOKFIELD SYNCHRO-LECTRIC modelo LVT, con microadaptador, capaz de medir a 0,3; 0,6; 1,5; 3, 6; 12; 30 y 60 r.p.m., con un *spindle* del nº 18; se ha utilizado, conectado al microadaptador, un baño termostatzado marca TANSON TC9, con una precisión de ± 1 °C.

- **ESPECTROFOTÓMETRO de ABSORCIÓN UV/VIS**

La medida de la absorbancia de las muestras se ha realizado en dos espectrofotómetros UV/VIS, uno de la firma SHIMADZU, modelo SHIMADZU UV 1603 y otro de la marca PERKIN ELMER, modelo 552 UV/VIS.

- **ESPECTROFOTÓMETRO de FLUORESCENCIA**

Para medir la fluorescencia de las muestras se ha empleado un espectrofluorímetro de la marca PERKIN ELMER modelo MPF-44 E.

Para el Ioduro de Propidio, la longitud de excitación y emisión fueron, respectivamente, de 536 y 623 nm, empleando una rendija de 19 para excitación y de 5 para emisión.

Para el Isotiocianato de Fluoresceína, las longitudes de onda de excitación y emisión fueron, respectivamente, de 494 y 520 nm, con una rendija de 4 para excitación y de 2 para emisión.

- **AUTOCLAVE**

Para la esterilización del material, a 120° C durante 20 minutos, se ha empleado un autoclave marca RAYPA, serie "Sterilmatic-C" modelo AE-110.

- **ELECTRODO de AMONIO**

En la medida de la concentración del nutriente nitrogenado disuelto se ha utilizado un analizador electro-químico marca ORION, modelo 720A. La medida se realiza por desplazamiento del amonio contenido en las muestras al aumentar el pH. Las moléculas de amonio en disolución pasan a amoniaco y éste atraviesa la membrana selectiva del electrodo. El amoniaco que se introduce en el electrodo es capaz de producir una señal eléctrica que, una vez analizada y comparada con la curva de calibrado, proporciona la medida de la concentración de amonio. El intervalo de concentración puede variar entre 1M y $5 \cdot 10^{-7}$ M.

• **CROMATOGRAFIA LIQUIDA de ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)**

El equipo de cromatografía líquida de alta resolución, HPLC, que se esquematiza en la Figura 2.7, presenta las siguientes características técnicas:

Bomba: KONTRON INSTRUMENTS (325 System), capaz de mantener un caudal constante entre 0,1 y 5 mL/min a una presión que puede variar entre 1 y 450 bar. Puede trabajar tanto en régimen isocrático como en gradiente, tanto de caudal como de composición, ya que está dotada de un mezclador de tres canales.

inyector Automático: KONTRON INSTRUMENTS-360, con capacidad para 60 muestras contenidas en viales de 2 mL. Tiene la posibilidad de termostatar las muestras y variar la cantidad de muestra inyectada, aunque en todos los análisis realizados se ha utilizado un volumen de muestra de 20 mL.

Horno: PERKIN-ELMER LC-100, mantiene la temperatura 5 °C por encima de la ambiental y hasta 99 °C, con una precisión de $\pm 0,1$ °C. La transmisión de calor se realiza por convección forzada de aire caliente. Está diseñado para albergar dos columnas de cromatografía de hasta 35 cm de longitud.

Detector: SEDEX 45, detector de dispersión de luz («light scattering»). Se basa en la dispersión de luz que se produce al incidir un rayo sobre un nebulizado que contiene la muestra a analizar. Es necesario fijar unas condiciones de temperatura de medida y de composición y presión en el gas que se utilizará para nebulizar la muestra.

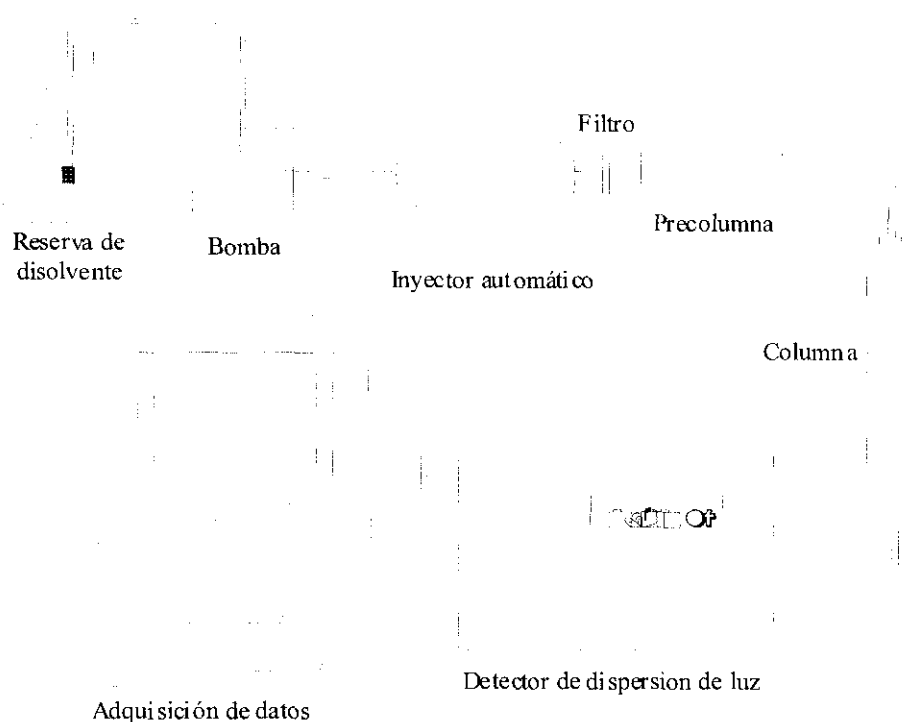


Figura 2.7.- Representación esquemática del equipo de HPLC utilizado.

• **CONTADOR de PARTÍCULAS**

Para el conteo del número de células, necesario para el procesamiento de las muestras por Citometría de Flujo, se empleó un contador COULTER modelo ZM empleando un tubo de 30 μm y un canalizador acoplado marca COULTER, modelo CHANNELIZER 256.

• **CITÓMETRO DE FLUJO**

Para el análisis de componentes intracelulares, se ha empleado un citómetro BRYTE-HS (Biorad, Hempstead UK), con lámpara de Xenon de 75 W, filtro de excitación de 488 nm, filtros de emisión de 510 nm para la fluorescencia verde y de 600 nm para la fluorescencia roja. El equipo pertenece al Centro de Citometría de Flujo (CMF) de la U.C.M., situado en la Facultad de Farmacia. Los componentes básicos de un citómetro de flujo son los siguientes (Figura 2.8):

Sistema de Flujo de Fluidos: El flujo producido es un flujo laminar, en el que se mezclan dos tipos de fluidos: el fluido de la muestra y el fluido de la vaina. Las partículas o células deben estar en suspensión, y son analizadas una a una, en el seno del líquido.

Sistemas Ópticos y Fotodetector: El flujo de partículas o células pasa a través de una zona iluminada por un rayo de luz focalizado. El impacto del rayo con cada célula genera señales ópticas que, una vez recogidas por medio de detectores, son convertidas en señales o eventos electrónicos que miden la magnitud de cada pulso.

Sistema Electrónico y Computador: Los pulsos generados son a su vez digitalizados y computerizados en un tiempo de milisegundos. Todo esto permite, por un lado, la visualización en pantalla en tiempo real de las medidas efectuadas en relación a cada uno de los parámetros analizados, la discriminación de partículas o células y establecer ventanas, puertas o regiones electrónicas de acotación o exclusión, que posibilitan la adquisición, almacenamiento y/o análisis de eventos correspondientes únicamente a unas determinadas subpoblaciones de interés, o bien la separación física de subpoblaciones. Además la CMF permite la obtención de medidas semicuantitativas y análisis multiparamétricos muy precisos.

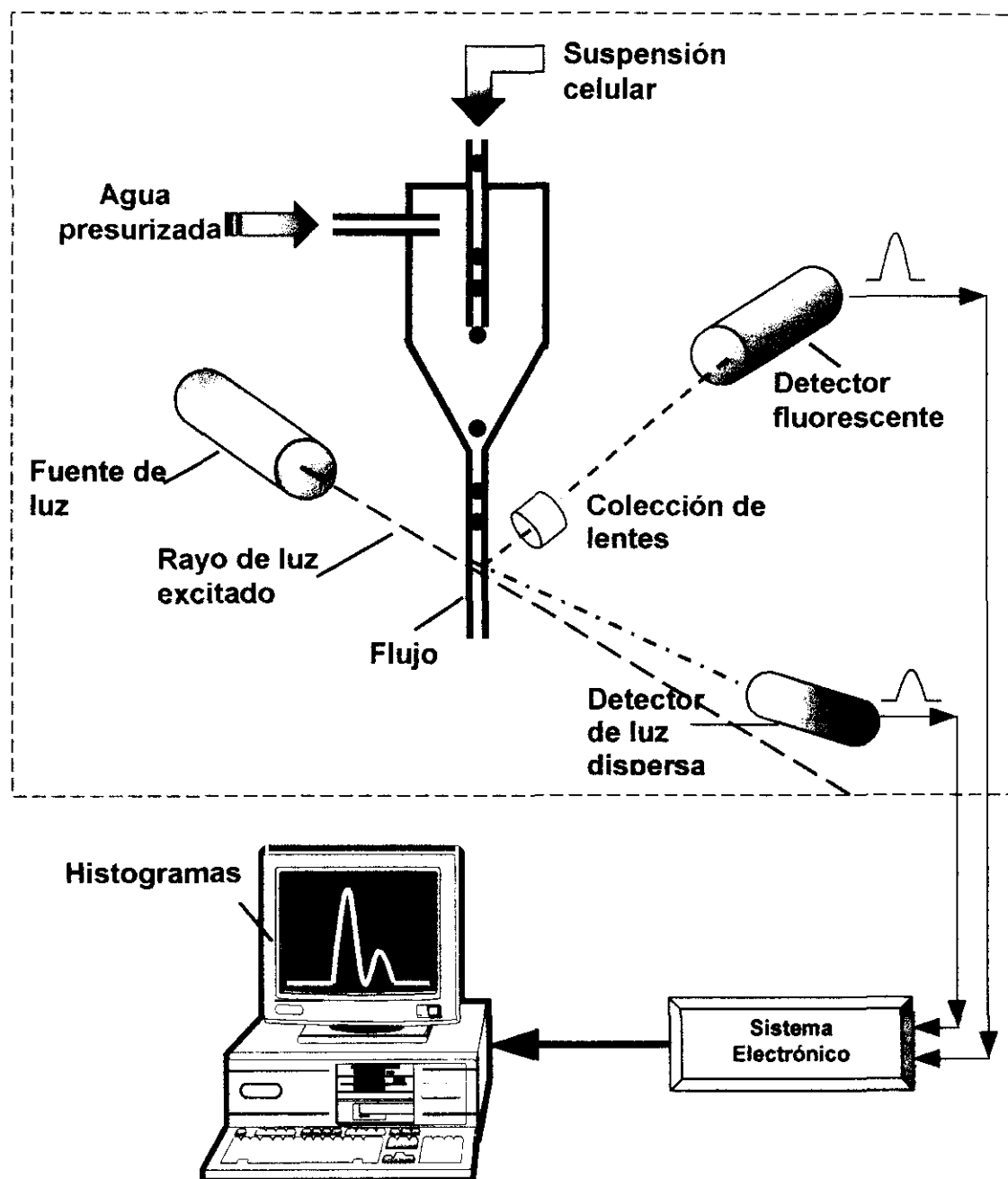


Figura 2.8.- Representación esquemática de un citómetro de flujo

2.2.- MATERIALES EMPLEADOS

2.2.1.- Microorganismo

El microorganismo empleado en el presente trabajo ha sido *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. La bacteria se obtuvo solicitándola a la siguiente colección:

Microbiologist Culture Collection Research. Fermentation Laboratory of United States. Department Agricultural. 1815 North University Street. Peoria. Illinois. 61604 U.S.A.

Existen tres cepas del microorganismo, como ya ha sido indicado en la Introducción. Como allí se comentó, las cepas Sm y Vs se producen por degeneración de la cepa L, debido a un envejecimiento del cultivo, que puede ser acelerado por una conservación deficiente. Por lo tanto, es necesario mantener la bacteria como cepa L, para obtener un xantano con buenas propiedades y con buen rendimiento. En la Figura 2.9 se muestra una placa de la cepa L, donde puede apreciarse el aspecto de las colonias de la bacteria.

Para la **conservación** y el **mantenimiento** de la cepa de *Xanthomonas campestris* se describen en la literatura dos procedimientos (Jeanes y col., 1976):

- Conservación a largo plazo: es un tipo de conservación no propagativa (la bacteria no crece ni se reproduce). Este tipo de conservación se recomienda realizarla liofilizando una pequeña parte del cultivo que se encuentra en condiciones óptimas. También se han descrito otras técnicas como la congelación y la conservación en tiras de papel (Jeanes y col., 1976).

- Conservación a corto plazo: este tipo de conservación es semipropagativa (la bacteria crece y se reproduce). Se realiza en slants (tubos con medio sólido), pero requiere una renovación del cultivo cada quince días (De Vuyst y col., 1987a y b; Silman y Rogovin, 1970) ya que si no se realizan transferencias del cultivo más o menos frecuentes, la cepa puede degenerar a Sm (Cadmus y col., 1976).

En este trabajo se realizó la conservación de la siguiente forma:

- A largo plazo: se conservó el microorganismo tanto liofilizado como por congelación. El liofilizado se realizó en la empresa PHARMAMAR S.A., creciendo previamente, en medio líquido el liofilizado obtenido de la colección americana y realizando una centrifugación del caldo, para obtener las células que posteriormente se liofilizan y encapsulan. La congelación fue realizada en Eppendorfs con glicerina al 10% y posterior congelación a la temperatura de -25°C .
- A corto plazo: el microorganismo es conservado en medio sólido, en este trabajo se ha empleado medio YMagar. Los slants son incubados durante un periodo de 18 a 20 horas en estufa de incubación a 25°C y manteniendo posteriormente el slant a 4°C durante un periodo de 14 días como máximo. Tras ese tiempo se renueva el cultivo traspasándolo a otro slant con medio YM-agar.

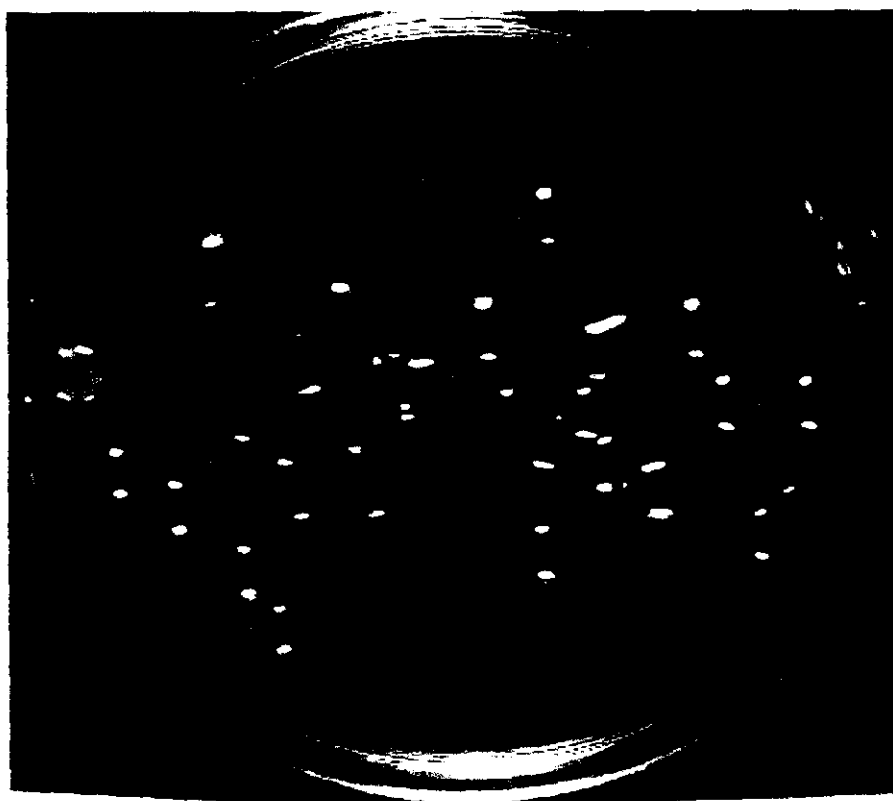


Figura 2.9.- Fotografía de las colonias formadas por *Xanthomonas campestris* sobre YMagar.

Para observar la viabilidad de la cepa de *X. campestris*, el procedimiento consiste en realizar siembras por agotamiento de asa en placa Petri en YM agar. Las placas se incuban a 25° C durante tres días.

2.2.2. Reactivos Utilizados

En la Tablas 2.1 a 2.6 aparecen los reactivos empleados, tanto para la preparación de los medios de cultivo como aquellos que se han ido utilizando en el análisis de los diferentes componentes del sistema.

En la Tabla 2.1 se muestran los reactivos empleados para la conservación, mantenimiento y crecimiento del microorganismo. En la Tabla 2.2 se recogen los reactivos empleados en la preparación del medio óptimo de producción, denominado en lo que sigue como medio A (García-Ochoa y col., 1992). En la Tabla 2.3 se indica el agente precipitante empleado en la extracción del producto. En las Tablas 2.4 y 2.5 figuran los reactivos utilizados en este trabajo para el análisis de los componentes intracelulares y, finalmente, en la Tabla 2.6, los empleados para el análisis de algunos de los componentes extracelulares.

Tabla 2.1.- Reactivos empleados para los medios de crecimiento y mantenimiento de microorganismos

Compuesto	Marca	Código
<i>Agar-Agar</i>	PROBUS	29210
<i>D(+) Glucosa Anhidra</i>	PANREAC	141341
<i>Extracto de Levadura</i>	OXOID	L21
<i>Extracto de Malta</i>	OXOID	L39
<i>Peptona Bacteriológica</i>	OXOID	L37

Tabla 2.2.- Reactivos empleados para el medio de producción de xantano, Medio A (García-Ochoa y col., 1992).

Compuesto	Marca	Pureza Química	Código
<i>Cloruro de Magnesio</i>	PROBUS	Puro	120410
<i>Acido Cítrico Cristalizado</i>	PROBUS	Puro	11510
<i>Ácido Bórico</i>	PANREAC	Puro	23687
<i>Ácido Clorhídrico</i>	PANREAC	35 %	141019
<i>Nitrato de Amonio</i>	PROBUS	Puro	21310
<i>Carbonato Cálcico</i>	PROBUS	Puro	10921
<i>Cloruro de Hierro (III)</i>	PROBUS	Puro	91410
<i>Oxido de Zinc</i>	PANREAC	Puro	15682
<i>Fosfato Potasio Mono-básico</i>	PANREAC	98%	141509
<i>Hidróxido de sodio</i>	PANREAC	97%	141687
<i>Sacarosa</i>	PANREAC	Puro	176820

Tabla 2.3.- Reactivos empleados para la precipitación y extracción del producto obtenido.

Compuesto	Marca	Pureza Química	Código
<i>Isopropanol</i>	VIUDA e HIJOS de MANUEL RIESGO	Puro	-

Tabla 2.4.- Reactivos empleados en los análisis por Citometría de Flujo y en la Espectrofluorimetría.

Compuesto	Marca	Pureza Química	Código
<i>Tris(hidroximetil) aminometano</i>	PANREAC	Puro	131940
<i>Cloruro Sódico</i>	PANREAC	Puro	141659
<i>Glutaraldehído</i>	RIEDEL-DE HAËN	25%	62621
<i>Deoxiribonucleasa I</i>	SIGMA	90 %	DN-25
<i>Ribonucleasa A</i>	SIGMA	85 %	R-5503
<i>Ioduro de Propidio</i>	SIGMA	95-98 %	P-4170
<i>Isotiocianato de Fluoresceína</i>	SIGMA	90 %	F-7250
<i>Rojo Nilo</i>	SIGMA	-	N-3013
<i>Albúmina de Suero de Bovino</i>	BOEHRINGER-MANNHEIM	-	10222
<i>DNA de Timo de Bovino</i>	BOEHRINGER-MANNHEIM	-	109223
<i>RNA de Levadura</i>	BOEHRINGER-MANNHEIM	-	104175

Tabla 2.5.- Reactivos empleados para la realización de análisis mediante pruebas bioquímicas.

Compuesto	Marca	Pureza Química	Código
<i>Lisozima</i>	BOEHRINGER MANNHEIM	Puro	107255
<i>Citrato de Sodio</i>	SIGMA	99%	S4641
<i>Dodecil Sulfato de Sodio</i>	SIGMA	>99%	L5901
<i>Sulfato Cúprico</i>	PANREAC	Puro	141648
<i>Tartrato de Sodio y Potasio</i>	PANREAC	Puro	141729
<i>Reactivo de Folin</i>	ANALEMA	Puro	P5
<i>Fenol</i>	PANREAC	Puro	141322

Tabla 2.6.- Reactivos empleados para el análisis de azúcares

Compuesto	Marca	Pureza Química	Código
<i>Kit enzimático Sacarosa/Glucosa</i>	BOEHRINGER-MANNHEIM	-	139041
<i>Acetonitrilo</i>	RIEDEL-DE HAËN	99,8 %	34881

2.2.3- Composición de los Medios Empleados

• MEDIO de CRECIMIENTO

YM	Extracto de Levadura	3 g/L
	Extracto de Malta	3 g/L
	Glucosa Anhidra	10 g/L

• MEDIO de PRODUCCIÓN

MEDIO A

Acido Bórico	0,006 g/L
Acido Cítrico	2,100 g/L
Acido Clorhídrico	0,130 mL
Carbonato Cálcico	0,020 g/L
Cloruro de Hierro (III)	0,0024 g/L
Oxido de Zinc	0,0060 g/L
Fosfato Potásio Mono-Básico	2,866 g/L
Cloruro de Magnesio	0,507 g/L
Sulfato Sódico	0,089 g/L
Nitrato Amónico	1,1440 g/L
Sacarosa	40,00 g/L

Se ajusta el pH a 7 con una disolución de NaOH.

2.2.4.- Composición de las Disoluciones Tampón y Preparaciones para Análisis

• DISOLUCIONES TAMPÓN

TAMPÓN TRIS

Tris Hidroximetil Aminometano	0,1 M
Cloruro Sódico	0,1 M
Se ajusta el pH a 7,5 con HCl	

TAMPÓN B

Dodecil Sulfato Sódico	1,5%(w/v)
Tris Hidroxim. Amino Met.	10 mM
Citrato Sódico	1 mM
Cloruro Sódico	10 mM
Se ajusta el pH a 8 con HCl	

• REACTIVOS LOWRY (Lowry y col., 1951)

LOWRY A

Carbonato de Sodio	2 % (w/v)
Hidróxido Sódico	0,1 N

LOWRY B

Sulfato de Cobre	0,5%(w/v)
Tartrato de Sodio y Potasio	1,0%(w/v)

LOWRY C

LOWRY A: LOWRY B	50:1
------------------	------

2.3.-REALIZACIÓN de un EXPERIMENTO

Todos los experimentos llevados a cabo en el presente trabajo se han realizado en fermentador. Para ello, se ha empleado un biorreactor de la marca Braun, modelo BIOSTAT M, tal y como se ha comentado en el apartado 2.1. El desarrollo de un experimento se detalla a continuación:

Para la **preparación del inóculo e inoculación** en el fermentador, se parte de un *slant* del microorganismo que no tenga más de tres días. Con asa de siembra, se obtiene un *loop* de inóculo que se transfiere al medio de crecimiento, en el que se va a preparar el inóculo (contenido en Erlenmeyer o en tubo de ensayo, según el caso); en esta operación se debe trabajar siempre cerca de la llama del mechero Bunsen y flamear la boca del Erlenmeyer o del tubo de ensayo, tanto después de abrirlo, como antes de cerrarlo. El medio de crecimiento inoculado se cultiva en la incubadora orbital en las condiciones óptimas para *Xanthomonas campestris* (Santos, 1993), que son las siguientes: temperatura 28° C, velocidad de agitación de 210 durante 12 h en el medio de crecimiento YM.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación del inóculo, se lleva éste a la cámara de flujo -previamente esterilizada con alcohol- y se toma, de modo estéril, una pequeña cantidad para realizar diluciones y conocer la concentración de biomasa obtenida. Este último detalle es imprescindible para la repetitividad de los resultados obtenidos en diversos experimentos.

El procedimiento a seguir para llevar a cabo la **esterilización del biorreactor** es el siguiente: antes de ser introducido en el citado autoclave, se prepara, de modo que se conecte al cuerpo del fermentador lo más rápidamente posible. Se deben colocar filtros, tanto para la entrada de aire como a la salida del refrigerante, que se cubren cuidadosamente con papel de aluminio y se sellan con cinta adhesiva. Así mismo, se colocan los electrodos de oxígeno disuelto, antiespuma y pH -éste último debe calibrarse antes de la esterilización- y se cubren también con papel de aluminio y con cinta adhesiva. También se cubre con papel de aluminio el conector de la sonda de temperatura Pt-100 y la salida de muestras.

El fermentador se debe esterilizar con el medio a emplear dentro, por lo que se deben pinzar todas las gomas de salida y entrada para evitar pérdidas. Cuando el medio que se va a emplear en el experimento no se puede esterilizar todo junto -por contener la fuente carbonada y sales inorgánicas-, se introduce en el reactor una parte del mismo, conteniendo todos los componentes excepto la fuente de carbono. El sustrato carbonado se prepara en un frasco aparte -de los preparados para control del pH, con salida al fermentador- y se esteriliza unido al mismo, tomando la precaución de pinzar la goma que los une, para evitar que haya paso de líquido de uno a otro.

Una vez introducido todo en el autoclave, se esteriliza a 120°C durante 30 minutos. Después de la esterilización, se quita la cinta adhesiva y el papel de aluminio y se conecta el fermentador al cuerpo del mismo; también se conecta la entrada y la salida de agua de la camisa y se abre la válvula de llenado. Se conectan el agitador, los tres electrodos y la bomba peristáltica, para que se introduzca el sustrato carbonado, si es el caso. El biorreactor se debe dejar durante al menos seis horas después de realizar los pasos comentados, para que el electrodo de oxígeno disuelto se polarice antes de ser calibrado. Transcurrido el tiempo de polarización, el fermentador ya se encuentra a la temperatura deseada. Una vez es introducida la fuente de carbono, se calibra el electrodo de oxígeno con nitrógeno y aire, fijando así el cero y el 100% de saturación, respectivamente, antes de realizar la inoculación. Se fija la agitación en 210 r.p.m. y el caudal de aire en 1 L/L/min.

Finalmente, se realiza la **inoculación**, una vez preparado el inóculo, como se ha comentado previamente, y conocida la concentración de biomasa en el medio, se procede a la inoculación en el fermentador. Para ello, se introduce a través de una membrana preparada al efecto, mediante una jeringa estéril. La membrana se cubre con alcohol y se prende fuego cuando se va a realizar la inoculación.

Para llevar a cabo el seguimiento de la evolución de este sistema durante el proceso, se realiza la **toma de las muestras a distintos tiempos**, así como el **análisis de las mismas**. En el fermentador, la toma de muestras se realiza por la salida superior. Una vez tomada la muestra se pinza la goma y se introduce alcohol por el extremo inferior, hasta la siguiente muestra, para evitar contaminaciones.

Las muestras deben ser tomadas en condiciones lo más asépticas posibles, por lo que los tubos donde van a ser almacenadas deben ser esterilizados previamente. Una vez tomada la muestra, es centrifugada a 4000 r.p.m. (2860 g) durante 30 min. con el fin de separar el caldo de las células, y de esta forma parar el crecimiento y la evolución de sustratos y productos. Una vez centrifugadas son almacenadas a 4° C para el posterior análisis de cada compuesto.

Preparaciones especiales de las muestras, como las necesarias para contar el número de células, o analizar por fluorescencia, citometría de flujo o microscopía electrónica, se detallan en puntos siguientes, dentro de los protocolos específicos para el análisis de cada componente.

2.4.- MÉTODOS DE ANÁLISIS DE COMPONENTES EXTRACELULARES

2.4.1.- Análisis de Biomasa

Para el análisis de *X. campestris* como biomasa se ha empleado un método turbidimétrico, es decir un método óptico basado en la absorbancia que presentan las bacterias en longitudes de onda del espectro visible. Consiste en medir la absorbancia de la muestra a una cierta longitud de onda, frente a un blanco. La longitud de onda empleada en el presente trabajo, para este análisis, fue de 540 nm y el blanco utilizado, agua destilada.

El calibrado del método se realizó en un trabajo previo (Santos, 1993). El ajuste de los datos experimentales por regresión lineal a la expresión de Lambert -Beer aparece en la ecuación [2.1].

$$C_X (g / L) = 0,285 \cdot A(540 \text{ nm}) \quad [2.1]$$

En la Figura 2.10 se muestra la recta de calibrado obtenida de la relación entre la absorbancia medida a 540 nm y la concentración de la bacteria.

En cuanto al seguimiento de la biomasa durante los experimentos las muestras obtenidas, durante la producción de xantano, eran tratadas según el siguiente protocolo experimental:

Se toma una muestra del biorreactor y se diluye con agua destilada, de modo que la absorbancia medida entre dentro de la región lineal de la curva de calibrado. El valor de absorbancia obtenido a 540 nm es convertido en concentración mediante la ecuación [2.1], que luego es corregida de acuerdo a la dilución realizada previamente.

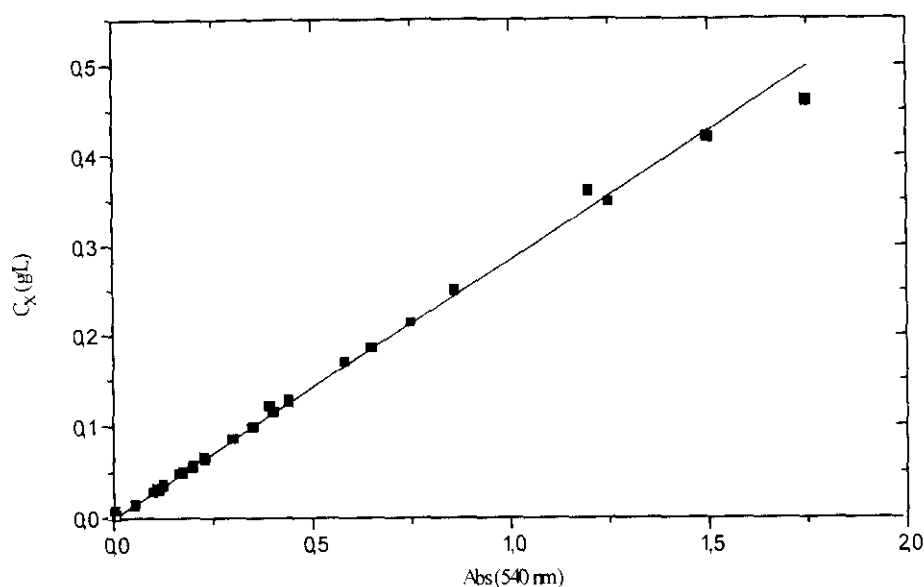


Figura 2.10.- Recta de calibrado para la medida de biomasa de *Xanthomonas campestris* por relación entre la absorbancia y el peso seco.

2.4.2.- Medida de la Concentración del Sustrato Carbonado

Para la determinación de la concentración del sustrato carbonado, esto es sacarosa, se han utilizado dos técnicas distintas, una basada en una prueba enzimática que ha sido realizada mediante un kit comercial y la otra basada en la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando un detector de dispersión de luz. La primera técnica se empleó inicialmente, pero cuando se dispuso del equipo de cromatografía líquida de alta resolución se empleó esta técnica en lugar de la técnica enzimática.

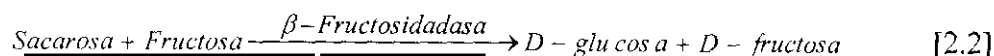
Para la determinación de la sacarosa, mediante un **kit enzimático comercial** se empleó un test de combinación de la marca Boehringer- Mannheim (nº de catálogo 139041). Antes de aplicar el kit de medida a las muestras, es necesario someterlas a un determinado tratamiento térmico, para detener las reacciones enzimáticas de las células bacterianas que puedan interferir en la medida. Dicho tratamiento se realiza conforme al siguiente protocolo:

Se introducen las muestras en baño de agua a 80°C, durante unos 15 minutos, y se centrifugan posteriormente a 5000 r.p.m. durante 20 min., siendo el sobrenadante de esta última operación, generalmente diluido, el que se utiliza para la determinación del azúcar correspondiente.

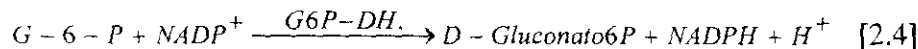
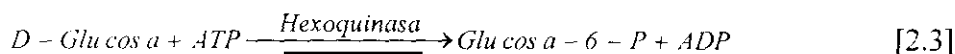


Para el análisis de sacarosa, se determina el contenido en D-glucosa antes y después de la hidrólisis enzimática de la sacarosa. Una vez preparada la muestra como se ha indicado, los pasos a seguir son los siguientes:

Inversión enzimática: La sacarosa se hidroliza mediante la β -fructosidasa (invertasa) a pH 4,6 en D-glucosa y D-fructosa, de acuerdo a:



Determinación de glucosa: Se añade la enzima hexokinasa (HK), que cataliza a pH 7,6- la fosforilación de la D-glucosa con adenosín-5'-trifosfato (ATP) bajo la forma simultánea de adenosín-5-difosfato (ADP). La glucosa-6-fosfato formada (G-6-P) es oxidada específicamente por el nicotinamin-adenin-dinucleótido (NADP) en presencia de la glucosa-6-fosfato-dehidrogenasa (G6P-DH) a gluconato-6-fosfato, formándose, a la vez, Nicotinamin-adenin-dinucleótido-fosfato (NADPH). La cantidad de NADPH formada durante la reacción es estequiométrica, con respecto a la cantidad de D-glucosa, y se determina por su absorbancia a 340 nm.



El cálculo de la cantidad de sacarosa presente en la muestra se realiza primero sustrayendo de la lectura de la absorbancia de la muestra la obtenida para el blanco:

$$\Delta A = \Delta A_p - \Delta A_B \quad [2.5]$$

Y el cálculo de la cantidad de sacarosa, por la siguiente ecuación:

$$C_X = \frac{V_1 \cdot M}{\delta \cdot d \cdot V_2 \cdot 1000} \cdot \Delta A \quad [2.6]$$

Siendo: V_1 el volumen del test, V_2 el volumen de la muestra, M el peso de la sustancia analizada el peso de la sustancia analizada d el paso óptico de la cubeta y δ el coeficiente de extinción molar del NADPH.

Como ya ha sido comentado, el análisis de este disacárido también fue realizado mediante **HPLC**. Para esta técnica, la preparación de la muestra solamente precisa la separación de las células del caldo de fermentación. Esta separación puede realizarse tanto por centrifugación a 5000 r.p.m (2000 g) durante 15 minutos, como por filtración a través de un

filtro Millipore de 0,2 μm . Como ya se ha comentado, para este análisis se ha utilizado un cromatógrafo marca KONTRON, modelo SEDEX 45, con detector de dispersión de luz. Las condiciones utilizadas han sido las siguientes: la columna empleada ha sido tipo Nucleosil NH_2 de 5 μm , con unas dimensiones de 250 x 4,6 mm. Se ha empleado como eluyente una mezcla Acetonitrilo/agua Mili Q en proporción 75:25, con un caudal de 1 L/min. En cuanto al detector, es de dispersión de luz, trabajando con una ganancia de 6, una presión de aire de 1,9 atm. y a 28° C de temperatura.

En la Figura 2.11 se muestra la curva de calibrado para la sacarosa y la Ecuación [2.7] da la relación entre el área del cromatograma y la concentración de este azúcar.

$$C_s(g/L) = 0,00863 \cdot A$$

[2.7]

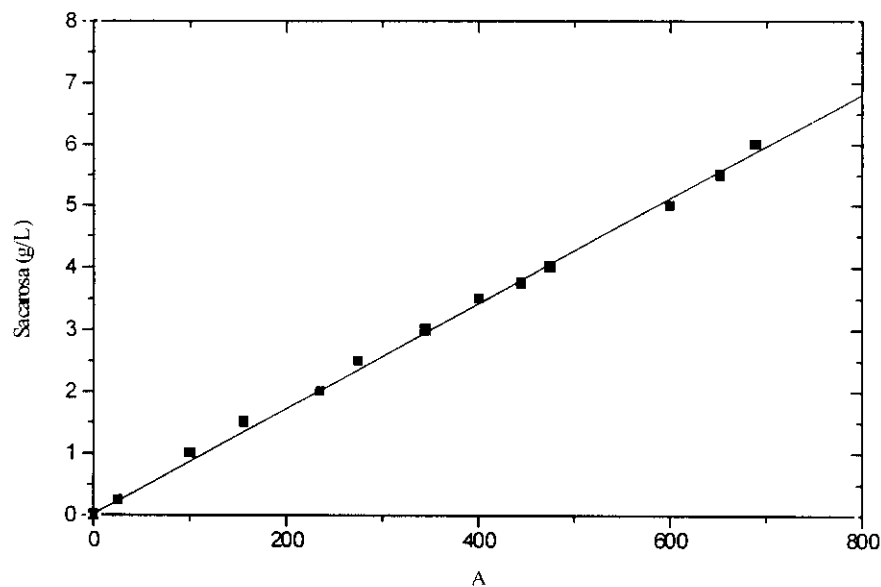


Figura 2.11 – Recta de calibrado en HPLC para el análisis de sacarosa.

2.4.3.- Análisis del Sustrato Nitrogenado

La concentración de nitrógeno (en forma de sal de amonio) ha sido medida en discontinuo, mediante un electrodo de membrana semipermeable de la casa ORION, modelo 720A. El procedimiento seguido para el análisis del amonio ha sido el siguiente:

Se toma una muestra de 10 mL y se adiciona una disolución de NaOH, hasta alcanzar valores de pH superiores a 10 (momento en el que el indicador suministrado por el fabricante, azul de timol, vira de incoloro a azulado); a pH alcalino se libera el nitrógeno amónico presente en la muestra, pasando a amonio gaseoso. El amoniaco generado atraviesa la membrana semipermeable del electrodo y produce una señal en el detector. Esta señal se compara con los datos del calibrado y, automáticamente, aparece en la pantalla del aparato la concentración de nitrógeno presente en la muestra. El calibrado se realiza introduciendo dos patrones de concentración conocida (10 y 100 p.p.m.). El intervalo de concentración de calibrado es de 0 a 100 p.p.m. Los patrones son analizados del modo indicado y la pendiente es calculada y almacenada por el aparato de modo que, una vez realizado el calibrado, la concentración es leída directamente en el aparato.

2.4.4.- Análisis de Xantano

El análisis del xantano se llevó a cabo estableciendo una relación entre la viscosidad del caldo y la concentración de xantano en una muestra dada. La viscosidad se mide generalmente a 30 r.p.m. entre 25 y 30°C (Silman y Rogovin, 1970 y 1972; Cadmus y col., 1976 y 1978; Souw y Demain, 1979; Tait y col., 1986; De Vuyst y col., 1987a y 1987b). En el presente trabajo, el análisis del contenido en xantano de las muestras se realizó mediante la determinación de la viscosidad, medida a 25 °C y 30 r.p.m. , de acuerdo a un procedimiento previamente establecido (Santos, 1993).

Para relacionar la viscosidad del caldo con la concentración de xantano en el mismo, se realizó el calibrado del método. Según las características del xantano disuelto, la relación entre la viscosidad de la disolución y la concentración de xantano puede ser muy diferente (Casas, 1989); en consecuencia, para calibrar este método de análisis se empleó el propio xantano obtenido en cada experimento para realizar el calibrado. El procedimiento seguido fue el siguiente:

Se toma un caldo resultante de la fermentación y se añade un volumen conocido de alcohol isopropílico (IPA), precipitando el xantano y quedándose en suspensión las bacterias. La relación caldo:IPA es normalmente superior a 1:2,3, debido a que no se empleó ninguna sal para no falsear la medida por pesada. Después de filtrar, lavar y secar, se mantiene en una estufa a temperatura de 50 °C, hasta pesada constante. Por otra parte, se realizan varias diluciones del caldo de fermentación y se mide su viscosidad a 25 °C y 30 r.p.m. Los valores obtenidos en cada caso se ajustaron a una ecuación de tipo potencial, por lo que las ecuaciones

de calibrado se recogen en cada experimento, es decir, cambian los valores de a y de b en la ecuación siguiente:

$$C_p = a \cdot \mu_a^b \quad [2.8]$$

La relación entre la viscosidad aparente del xantano (μ_a) con su concentración (g/L) de acuerdo con la Ecuación [2.8] para cada experimento, se muestra en la Tabla 2.7.

Tabla 2.7- Valores de los parámetros a y b de la ecuación [2.8] para los diferentes experimentos realizados en los que se varían las condiciones que se indican en la primera columna.

Experimento	a	b
25° C, 257 p.p.m NH_4^+	0,12	0,97
28° C, 257 p.p.m NH_4^+	0,34	0,70
31° C, 257 p.p.m NH_4^+	0,43	0,51
34° C, 257 p.p.m NH_4^+	2,05	0,34
28° C, 65 p.p.m NH_4^+	0,77	0,32
28° C, 130 p.p.m NH_4^+	0,77	0,31
28° C, 475 p.p.m NH_4^+	0,23	0,71

2.5.- ANÁLISIS de COMPONENTES INTRACELULARES

Para el desarrollo de Modelos Cinéticos Químicamente Estructurados es necesario realizar el análisis de ciertos componentes intracelulares durante el proceso, como ya se citó en el primer capítulo de esta Memoria. El análisis de estos componentes permite explicar la evolución del sistema cuando el microorganismo es sometido a determinados factores externos que pueden afectar al crecimiento y por tanto a la evolución de sus componentes estructurales.

La Citometría de Flujo (CMF) parece ser la mejor técnica para poder realizar un seguimiento del proceso, teniendo en cuenta los cambios producidos intracelularmente cuando el microorganismo se encuentra bajo diferentes condiciones ambientales.

La técnica de la CMF es analítica y preparativa, y se puede utilizar para el análisis de células tanto eucariotas como procariotas. Se basa en la medida de la emisión de fluorescencia y dispersión de luz inducidos por la iluminación apropiada de células o partículas en suspensión para ser analizadas en el seno de un líquido con flujo laminar (Maftah y col., 1993).

La CMF presenta importantes ventajas con respecto a otras técnicas analíticas, por ejemplo permite la caracterización de células individuales en términos de distribución de sus componentes, tales como DNA, RNA, y proteínas, o bien de sus propiedades tales como viabilidad, tamaño, variación morfológica (complejidad), etc.; además, permite análisis multiparamétricos con alto grado de precisión. En la Tabla 2.8 se muestran algunos de los principales parámetros biológicos analizables por CMF, tanto mediante el uso de fluorocromos como sin ellos, siendo posible también el análisis simultáneo de varios de estos parámetros.

El citómetro empleado en este trabajo, como ya se indicó en el apartado 2.1, pertenece al C.A.I del servicio común de investigación de la Facultad de Farmacia de la U.C.M (marca Bryte, modelo HS, Biorad Hempstead UK).

Tabla 2.8.- Parámetros analizables mediante Citometría de Flujo.

	PARÁMETROS ESTRUCTURALES	PARÁMETROS FUNCIONALES
SIN FLUOROCROMO	Volumen Celular Complejidad Celular Pigmentos	Potencial REDOX Viabilidad celular
CON FLUOROCROMO	Macromoléculas Orgánulos Subcelulares Receptores Metabolitos de Bajo Peso molecular	Integridad de membrana Movimientos iónicos Potencial de Membrana Viabilidad Celular Síntesis de DNA Transporte Celular

Esta técnica ha sido habitualmente utilizada para analizar células eucariotas (Hullet y col., 1969; Crissman y col. 1975), especialmente células sanguíneas. Su aplicación para el análisis de células procariotas es menor, debido a que el contenido en constituyentes objeto de análisis (componentes intracelulares), en dichas células procariotas, es de dos a cuatro órdenes de magnitud inferior que en eucariotas, lo cual hace que se requieran equipos mucho más sensibles (Steen y Boye, 1980; Steen y col., 1982).

Existen pocos estudios donde se emplee la CMF para el seguimiento de los componentes de la población durante un proceso fermentativo, esto es, para el estudio de transformaciones microbianas (Bailey, 1978; Fazel-Madjlessi y col., 1979; Agar y Bailey, 1982; Alberghina y col., 199; Alberghina y Porro, 1993).

Bailey y colaboradores (Bailey, 1977; Bailey y col., 1978; Fazel-Madjlessi y Bailey, 1979) emplean la CMF para conocer la evolución de componentes intracelulares en bacterias, apuntando la necesidad de conocer la cantidad de cada componente para la aplicación de Modelos Cinéticos.

A pesar de las enormes ventajas de la CMF frente a otras técnicas, como las microbiológicas o bioquímicas convencionales, esta técnica presenta inconvenientes a la hora de emplear los datos necesarios para la formulación de Modelos Cinéticos, debido a

que dichos datos vienen dados en unidades relativas (unidades de fluorescencia) y no en absolutas (unidades de concentración), como es necesario para dicha tarea.

Para obtener valores cuantitativos mediante Citometría de Flujo es necesario disponer de estándares con los que poder comparar, para interpretar correctamente los resultados relativos obtenidos por CMF (Alberghina y col. 1991). Para las distribuciones de tamaño y volumen celulares en diferentes experimentos, el canalizador puede ser calibrado mediante estándares de tamaño y volumen conocido. Sin embargo la medida de fluorescencia es siempre relativa, no disponiendo de estándares de componentes intracelulares de concentración conocida para el calibrado del aparato. Algunos autores realizan una comparación entre los datos de Intensidad de Fluorescencia (IF) con los datos cuantitativos obtenidos mediante otras técnicas; por ejemplo, Agar y Bailey (1982) y Alberghina y col. (1991) emplean técnicas bioquímicas para determinar esta relación, pero sólo Agar y Bailey. (1982) muestran una correlación entre el número de canal del citómetro con la cantidad de componente por célula obtenido por análisis mediante técnicas bioquímicas.

Basados en el trabajo llevado a cabo por Agar y Bailey (1982), se abordó el estudio para establecer una correlación entre los datos obtenidos mediante CMF con otras técnicas de análisis.

2.5.1.- Análisis de Componentes Intracelulares por Espectrofotometría de Absorción

Con el fin de llevar a cabo una cuantificación de los componentes celulares y, de esta forma, obtener datos cuantitativos con los que relacionar los de Intensidad de Fluorescencia (IF) obtenidos mediante CMF, se realizó la puesta a punto de técnicas para el análisis de proteína total, DNA y RNA a lo largo de una fermentación llevada a cabo por *Xanthomonas campestris* realizada en fermentador y bajo las condiciones óptimas de producción de xantano (Santos, 1993).

2.5.1.1.- Análisis de Proteínas

Para realizar la cuantificación de proteínas totales se empleó el método de Lowry (Lowry y col., 1951), por ser una de las técnicas más habitualmente utilizadas. Se trata de

un método colorimétrico basado en el hecho de que los grupos fenólicos de las tirosinas presentes en las proteínas reducen el reactivo de Folin, dando un complejo de color azulado cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteína. Para la formación del complejo azulado es necesario que las tirosinas estén accesibles al reactivo de Folin, para lo cual se añaden iones calcio que se unen a las proteínas dando complejos proteína - calcio.

Previo a la aplicación de esta técnica, fue necesario poner a punto un protocolo de rotura celular y homogeneización de las células que es detallado a continuación.

El primer paso a realizar es el **lavado y rotura de células**, con esta etapa se pretende obtener el homogeneizado de la muestra sobre el que se va a realizar el análisis. Para ello, se toma un volumen determinado de muestra y se centrifuga durante 30 minutos a 4000 r.p.m. (2860 g) con el fin de separar las células del medio de cultivo. Se resuspende el precipitado en tampón Tris. Esta operación se debe realizar al menos cinco veces, con el fin de eliminar todo el polisacárido que pudiera estar pegado a las células, lo cual introduciría un error enorme en este ensayo en concreto, debido a la interferencia entre el xantano con el reactivo de Folin.

Se vuelve a centrifugar a 4000 r.p.m (2860 g) durante 15 minutos y el precipitado se resuspende en 2 mL de una disolución de lisozima (10 mg/mL en tampón Tris). Se agita y sonica durante 1 minuto para romper los agregados que pudieran dificultar la acción de la enzima. A continuación, se incuba la muestra a 37 °C durante 30 minutos; pasado este tiempo se añade 100 µL del Tampón B. Se incuba con este tampón durante 10 minutos a 37 °C. Finalmente, se adiciona 1 mL de una disolución de NaOH 1N para detener la reacción enzimática.

Una vez obtenido el **homogeneizado**, se toma 1 mL y se le añaden 5 mL del reactivo Lowry C (Lowry A:Lowry B, 50:1), se agita e incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añaden 0,5 mL del reactivo de Folin (dilución 1/2), se agita bien la mezcla e incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Finalmente se procede a la **lectura de la absorbancia** a 500 nm, empleando como blanco agua destilada a la que se le haya efectuado el mismo tratamiento que a las demás muestras desde la etapa de adición de la lisozima, la cual será cuantificada también como proteína y cuya concentración debe ser restada en todas las muestras.

Los valores de absorbancia obtenidos son extrapolados en la curva patrón previamente realizada con patrones de Albúmina de suero de bovino (BSA) con concentraciones entre 10 y 100 µg/mL.

La Ecuación [2.9] es la obtenida mediante ajuste por regresión lineal de los valores de la absorbancia con la concentración, el valor del coeficiente de correlación obtenido de este ajuste es $r=0,998$. En la Figura 2.12 se muestran los resultados obtenidos.

$$C_{PR}^A = 417,67 \cdot A_{500}$$

[2.9]

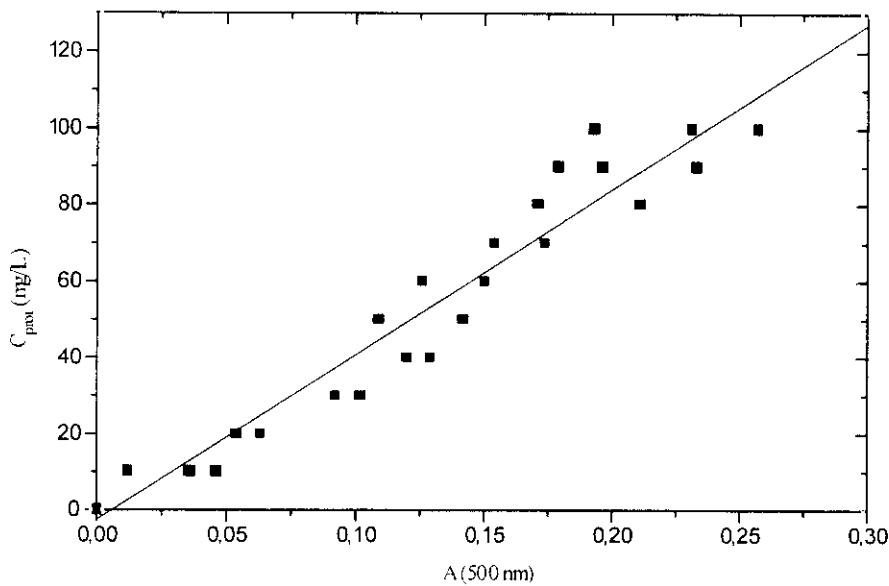


Figura 2.12.- Calibrado para proteínas obtenido mediante el método de Lowry.

Se realizaron medidas de la evolución de proteínas a lo largo de una fermentación para la producción de xantano empleando este método. La Figura 2.13 muestra los resultados obtenidos para dos ensayos realizados con cada una de las muestras tomadas a diferentes tiempos. Como puede observarse, ambos ensayos proporcionan resultados similares, lo que estaría indicando la buena reproducibilidad del método de Lowry para el análisis de proteínas.

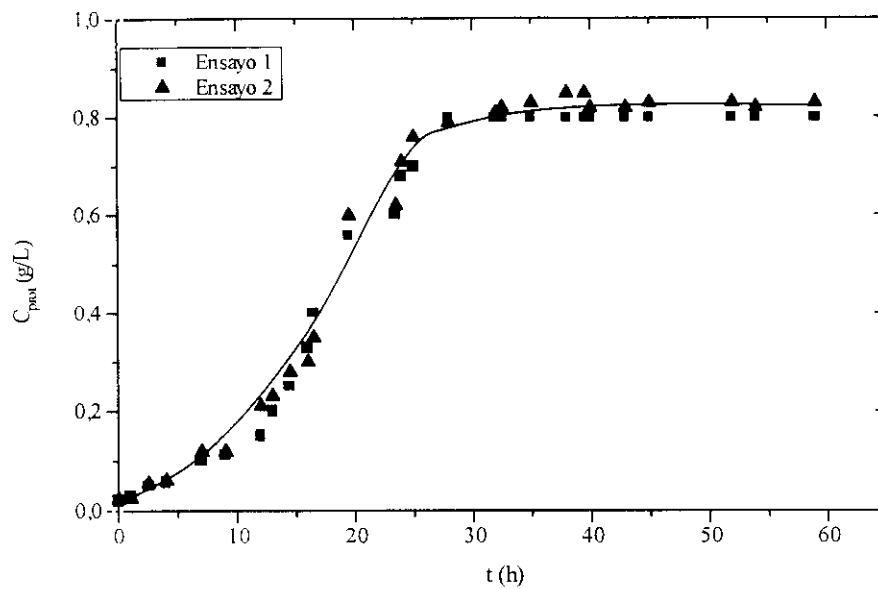


Figura 2.13.- Evolución de proteínas intracelulares de *Xanthomonas campestris* por análisis con el método Lowry.

2.5.1.2. Análisis de Ácidos Nucleicos

Los ácidos nucleicos de la bacteria objeto de estudio fueron extraídos y purificados a partir de las células mediante un procedimiento que puede considerarse una modificación del método de Sambrook (Maniatis y col., 1983).

El análisis requiere de la digestión enzimática con RNAasa para la medida del DNA y con DNAasa para el análisis de RNA, pues ambos componentes interfieren en el análisis debido a que la técnica se basa en la absorbancia a 260 nm que es la longitud de onda característica de los cromóforos de los ácidos nucleicos, esto es, de las bases nitrogenadas.

Inicialmente se realizó el análisis previa rotura de células y posterior digestión con la enzima correspondiente, pero debido a la labilidad de las moléculas de ácido nucleico se invirtió el orden en este protocolo, es decir una primera etapa en la que se trataba con DNAasa o RNAasa (previa permeabilización de las células a las enzimas) y una posterior etapa de rotura celular, de esta forma se consiguió una significativa mejora en la repetitividad de los resultados.

El **protocolo** de preparación de las muestras para el análisis de Ácidos Nucleicos mediante el método de Sambrook Modificado se detalla a continuación:

En primer lugar debe realizarse el **lavado** de las células mediante centrifugación a 4000 r.p.m. (2860 g) durante 30 minutos y resuspensión del precipitado en el tampón Tris. Esta operación se repite 5 veces para eliminar el xantano adherido a las células. A continuación se procede al **fijado** de las células, con ello se pretende abrir poros en la pared de la bacteria para permeabilizarla a las enzimas que se van a emplear. Para ello, una vez lavadas las células se centrifugan a 4000 r.p.m. (2860 g) durante 15 minutos y se resuspenden en 3 mL de la disolución de glutaraldehído al 3% en Tris 0,1 M - NaCl 0,1 M, se agita y sonica durante 1 minuto para disgregar los agregados de células, que se forman con frecuencia, y finalmente se incuba durante 4 horas a 4°C.

Una vez eliminado el glutaraldehído mediante centrifugación a 4000 r.p.m. (2860 g) durante 15 minutos, y la posterior resuspensión en tampón Tris, las muestras son pasadas a Eppendorf previamente esterilizados. Las células son centrifugadas a 10000 r.p.m. (18000 g) durante 10 minutos y resuspendidas en una disolución de **DNAasa** 1 mg/mL cuando se quiera analizar RNA y en una disolución de **RNAasa** 1 mg/mL cuando lo que se quiere analizar es DNA. Se incuba, en ambos casos a 37°C, durante 30 minutos.

Pasado el tiempo de incubación, las células son tratadas para conseguir su rotura. Para ello, se centrifuga a 10000 r.p.m. (18000 g) durante 10 minutos y se resuspende el precipitado en una solución de lisozima 10 mg/mL se agita e incuba durante 15 minutos a 37 °C y, a continuación, se añade 100 µL de tampón B, se incuba durante 15 minutos a 37° C y se mezcla cada 5 minutos por inversión.

Pasado el tiempo de incubación, se realiza la **extracción y purificación del ácido nucleico**, para lo cual se añaden 400 µL de fenol (equilibrado en tampón Tris), se agita suavemente y se centrifuga durante 5 minutos a 10000 r.p.m, con esto se consigue la desproteinización, quedando el ácido nucleico en la fase superior. Dicha fase se pasa a un Eppendorf limpio, añadiéndose 400 µL de una disolución de cloroformo - alcohol isoamílico, se agita y centrifuga a 10000 r.p.m. durante 5 minutos. Se pasa la fase superior a Eppendorf limpio y se repite esta operación 2 ó 3 veces (fenol, cloroformo-alcohol isoamílico). Finalmente se pasa la fase superior a un tubo de vidrio estéril y se añaden 2 mL de etanol al 90 % (a 4°C) dejándolo resbalar por las paredes para que queden dos fases. Se deja precipitar de 1 a 4 horas a -70°C.

Se recoge el ácido nucleico precipitado mediante centrifugación, se lava el precipitado con 500 µL de etanol al 70 %.y después se resuspende en 1 mL de tampón Tris.

Luego se preparan diluciones a partir del ácido nucleico resuspendido empleando el mismo tampón.

Se lee la **absorbancia a 260 nm**. También es necesario medir la absorbancia a 280 nm para conocer si el ácido nucleico extraído está impurificado con proteínas. Si el cociente entre la lectura de absorbancia a 260 nm y el de 280 nm es aproximadamente 1,8 el DNA está puro; en cuanto al RNA este cociente debe ser próximo a 2, para poder considerar que se ha purificado. Para convertir los valores de absorbancia en concentración se realiza de la siguiente forma (Sambrook y col., 1987):

Para RNA: 1 unidad de absorbancia es aproximadamente 40 $\mu\text{g/mL}$

Para DNA: 1 unidad de absorbancia es aproximadamente 50 $\mu\text{g/mL}$.

Los **resultados experimentales** del análisis de las muestras tomadas del fermentador se muestran en la Figura 2.14 para el DNA y en la Figura 2.15 para el RNA. Como se puede observar, los valores obtenidos en cada ensayo son bastante diferentes y, por tanto, el método no permite obtener resultados repetitivos. La dispersión obtenida en los resultados proporcionados por el análisis descrito hace que este método no sea aplicable para conseguir datos utilizables en el desarrollo de modelos cinéticos, ya que en ocasiones el error llega al 70%. No obstante, hay que comentar que desde un punto de vista cualitativo los resultados son buenos, debido a la buena purificación del ácido nucleico.

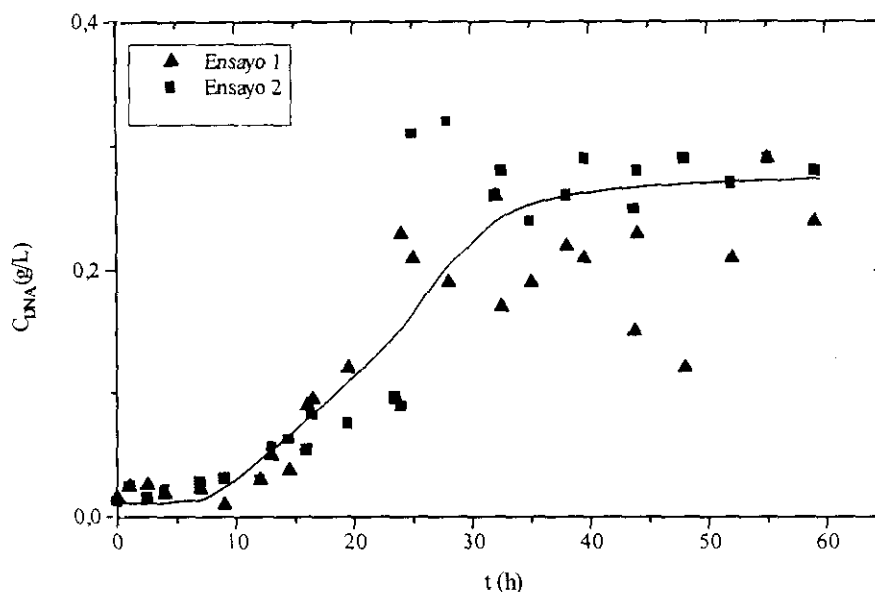


Figura 2.14.- Evolución de la concentración de DNA de *X. campestris* medida por el método de Sambrook modificado.

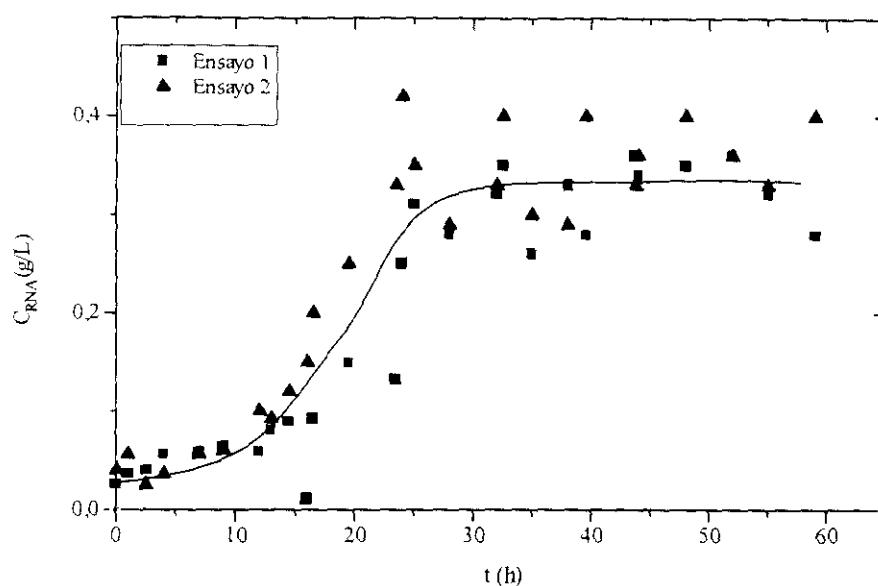


Figura 2.15.- Evolución de la concentración de RNA de *X. campestris* medida por el método de Sambrook modificado.

De todo lo anterior sobre el análisis de componentes intracelulares mediante pruebas bioquímicas basadas en la medida de absorbancia por espectrofotometría de absorción se puede concluir que el método Lowry permite una buena cuantificación de las proteínas, mientras que el método de análisis de ácidos nucleicos no aporta resultados repetitivos, debido a ciertos inconvenientes que pueden resumirse en los siguientes aspectos:

- 1.- Las sucesivas centrifugaciones requeridas en el análisis pueden provocar la pérdida de cierta cantidad del componente.
- 2.- Puede existir un elevado error en el método debido a la interferencia I y en la absorbancia a 260 nm, entre las proteínas y los ácidos nucleicos.
- 3.- La ruptura y degradación de las moléculas a analizar (debido a su labilidad) pueden suponer también una fuente importante de error.

2.5.2.- Técnicas de Fluorescencia

Debido a que no se obtuvieron buenos resultados con las técnicas basadas en la espectrofotometría de absorción para la cuantificación de componentes intracelulares y su posterior relación con los datos obtenidos mediante CMF, fue necesario buscar otra técnica que permitiese solventar los inconvenientes observados, básicamente relacionados con la rotura y extracción del componente intracelular.

Por ello, la técnica que se empleó fue la Espectrofluorimetría (EFM), que se basa, al igual que la CMF, en la medida de la intensidad de fluorescencia de los fluorocromos unidos de forma específica al componente objeto de análisis. La gran ventaja ofrecida por esta técnica es que la preparación de las muestras es idéntica a la seguida para Citometría de Flujo, es decir no implica rotura celular ni extracción del componente. Además permite obtener curvas patrón para la correlación entre la intensidad de fluorescencia con la concentración del componente.

El fluoróforo más habitualmente empleado para la tinción de proteínas es el Isotiocianato de Fluoresceína (ITCF), el cual forma uniones covalentes permitiendo el análisis de proteína total (Petit y col., 1993).

El protocolo de preparación de las muestras para el análisis de proteínas mediante ambas técnicas fluorimétricas (CMF y EFM) se detalla a continuación y se presenta esquematizado en la Figura 2.16.

En primer lugar debe realizarse el **lavado y fijado** de las células, siendo esta etapa idéntica a la ya descrita en el apartado anterior. Con ello, además de eliminar el xantano pegado a las células, se consigue la permeabilización de la pared del microorganismo para que entren tanto los fluorocromos como las enzimas.

Con el fin de llevar siempre un determinado número de células al Citómetro, es necesario **ajustar la concentración** de las mismas. Este ajuste se ha realizado por conteo mediante el contador de partículas Coulter Counter con un tubo de 30 μm , y diluyendo las muestras en tampón Tris para llevar un número de células en un intervalo entre 500-2000 cel/ μL . Una vez ajustada la concentración, las muestras son pasadas a Eppendorf estériles con el fin de proceder a la tinción específica.

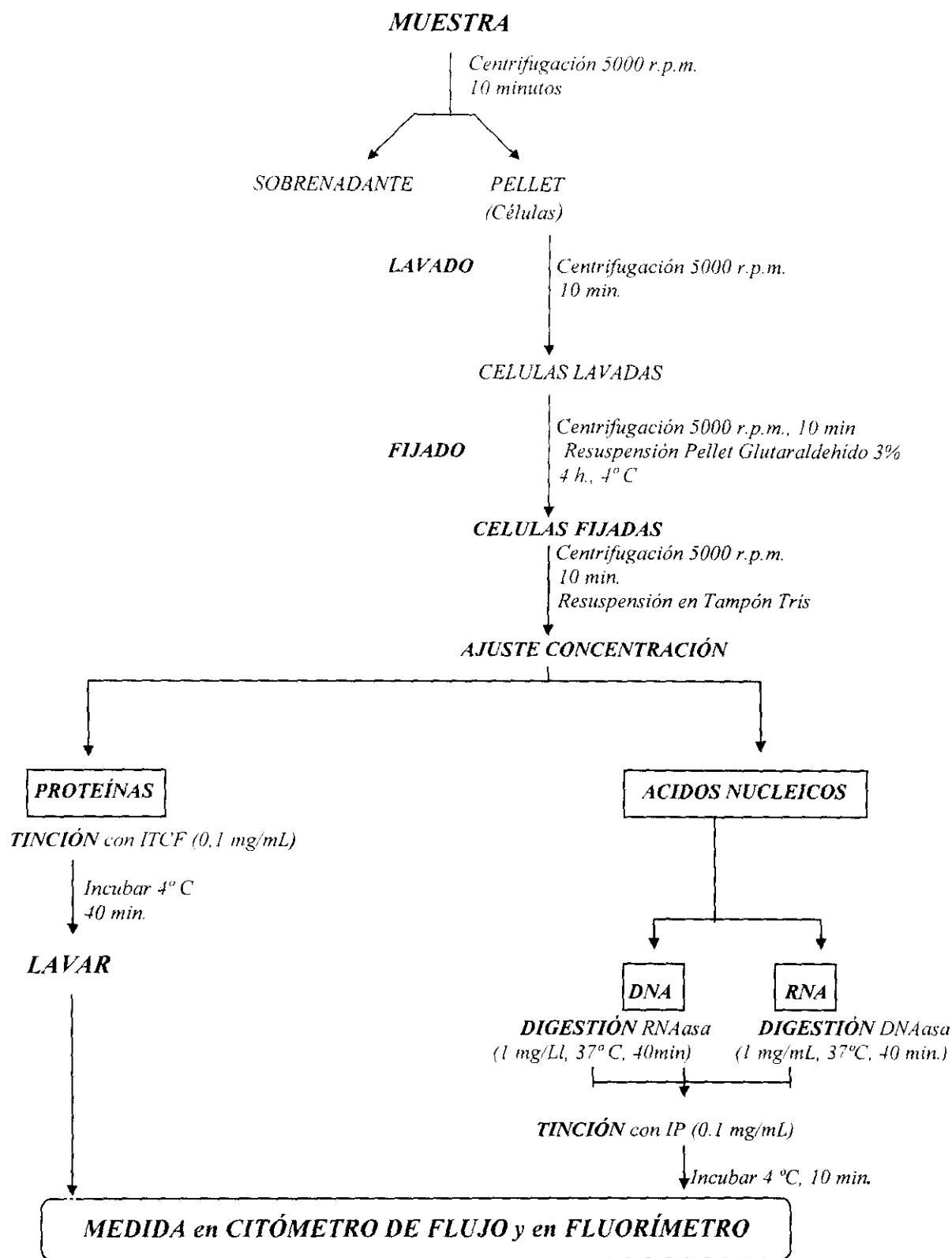


Figura 2.16.- Protocolo de preparación de las muestras para análisis por Espectrofluorimetría y Citometría de Flujo.

Para la **tinción con ITCF** se centrifuga a 10000 r.p.m. (18000 g) durante 10 minutos. El precipitado es resuspendido en una disolución de ITCF de 0,1 mg/mL se agita e incuba a 4 °C durante 1 hora, posteriormente se lavan las células tres veces en Tampón Tris, para eliminar el exceso de fluoróforo que podría provocar problemas en la fluorescencia de fondo en el análisis.

Para la **lectura de fluorescencia** en el espectrofluorímetro, la longitud de onda de excitación ha sido 498 nm con una rendija de 4, para la emisión, la longitud de onda fue de 520 nm y una rendija de 2. La temperatura de análisis fue 25° C en todos los casos.

Los valores de fluorescencia obtenidos son extrapolados en la curva patrón previamente realizada con BSA (albúmina de suero de bovino) de concentración conocida, para obtener las curvas correspondientes se realizó el calibrado de la siguiente forma:

Calibrado del Análisis por Fluorimetría para Proteínas

Para el calibrado de proteínas se empleó albúmina de suero de bovino (BSA). Debido a que el fluoróforo empleado para la tinción de proteínas (Isotiocianato de Fluoresceína) emite fluorescencia tanto si se encuentra unido a las moléculas de proteína como si no lo está, fue necesario eliminar el exceso de ITCF para evitar de esta forma la fluorescencia de fondo. Para ello, se aplicó una disolución de 1 mg/mL a una columna de filtración de membrana (PD10). Las primeras fracciones son las correspondientes a la proteína unida al ITCF. Se realizó una valoración de la concentración proteica de esta fracción, para lo cual se empleó el método de Lowry (Lowry y col., 1951). A partir de esta disolución se preparan muestras en un intervalo de concentración entre 0,01 a 0,5 mg/mL. Los resultados de la relación intensidad de fluorescencia (IF) con la concentración de proteínas se reflejan en la Ecuación [2.10], en este ajuste el coeficiente de correlación fue de $r=0,952$.

$$C_{PR}^F (g / L) = 1,93 \cdot 10^{-3} \cdot IF^F \cdot FD \quad [2.10]$$

La Figura 2.17 muestra **los resultados** obtenidos al analizar la evolución de las proteínas mediante espectrofluorimetría a lo largo de la fermentación. Los datos son expresados en concentración, por extrapolación de la intensidad de fluorescencia de acuerdo a la ecuación [2.10]. Los resultados para los dos ensayos realizados son repetitivos al igual que ocurría con el análisis mediante el método Lowry.

Aunque los resultados obtenidos para el análisis de proteínas mediante el método Lowry eran repetitivos, se decidió realizar la correlación de los datos obtenidos mediante

CMF con los obtenidos mediante espectrofluorimetría. La razón fundamental es que la preparación de las células por ambas técnicas de análisis es idéntica.

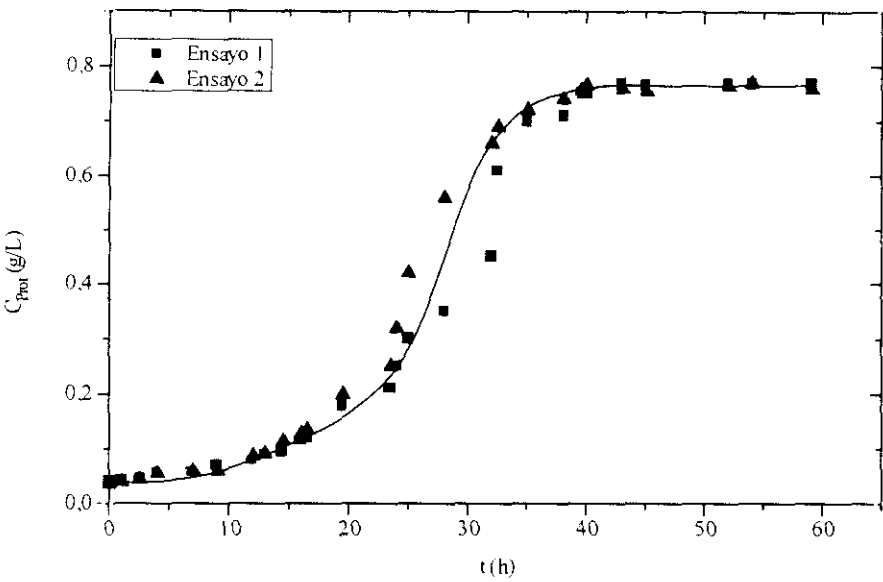


Figura 2.17.- Evolución de proteínas obtenida mediante EFM.

Para llevar a cabo el **calibrado** de los datos obtenidos por **CMF** con los obtenidos por **EFM** se emplearon 50 muestras, las cuales se obtuvieron a lo largo de un proceso fermentativo con el fin de obtener datos a lo largo de toda la fase de crecimiento del microorganismo y así obtener todo el intervalo de concentración posible de proteínas. La Figura 2.18 muestra la relación entre el valor de Mean (intensidad media de fluorescencia por célula) con el contenido por célula (g/célula) de proteína obtenido al extrapolar los datos de IF^F en la Ecuación [2.10]. La curva de calibrado se ha obtenido con muestras con un número de células comprendido entre 200 a 2000 cel/ μL. La Ecuación [2.11] muestra la correlación obtenida de esta forma:

$$C_{PR}^C(g / L) = (0,25 \cdot IF - 5,95) \cdot FD \cdot NC \tag{2.11}$$

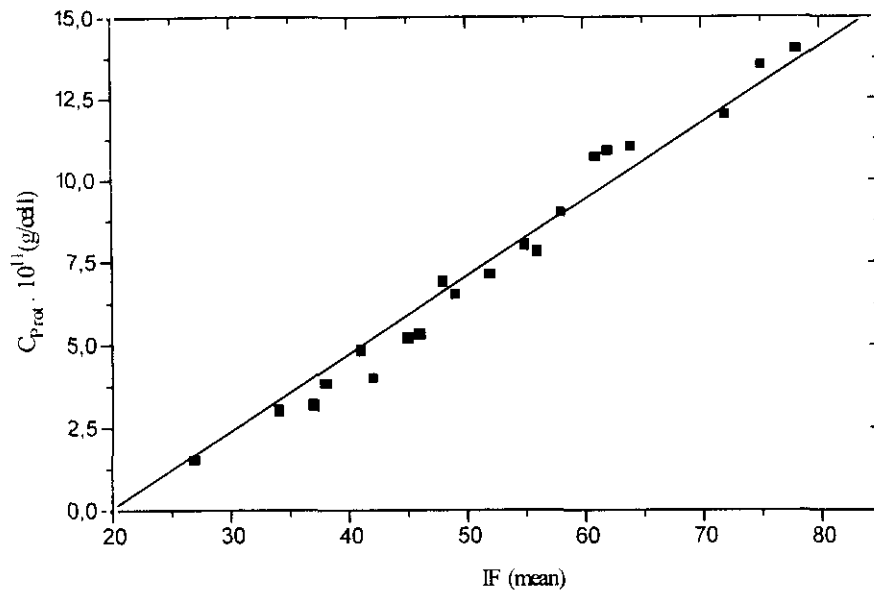


Figura 2.18.- Calibrado CMF - Espectrofluorimetría para Proteínas.

Para el **Análisis de Ácidos Nucleicos**, el fluoróforo empleado para la tinción de ambos tipos de ácidos nucleicos es el Ioduro de Propidio (IP) que es un agente intercalante entre pares de bases en ácidos nucleicos de doble hebra; por tanto se une tanto a DNA como a RNA, lo que implica que debe realizarse un tratamiento previo con RNAasa o con DNAasa en función del ácido nucleico a analizar (Petit y col., 1993).

Se pueden emplear también fluoróforos específicos para cada tipo de ácido nucleico, por ejemplo naranja de acridina para RNA y DAPI para DNA (Maftah y col., 1993), pero, en principio, se decidió realizar el estudio con IP, por ser uno de los fluoróforos más habitualmente empleados.

El **protocolo** de preparación de las muestras para el análisis de ácidos nucleicos mediante ambas técnicas fluorimétricas (CMF y EFM) se muestra también de forma esquemática en la Figura 2.16, presentada anteriormente, el protocolo de este análisis se detalla a continuación:

En primer lugar, debe de realizarse el **lavado y fijado** de las células, siendo esta etapa idéntica a la ya descrita en el apartado anterior. Con ello, además de eliminar el xantano pegado a las células, se consigue la permeabilización de la pared del microorganismo para que entren tanto los fluorocromos como las enzimas.

Con el fin de llevar siempre un parecido número de células al citómetro, es necesario **ajustar la concentración** de las mismas. Esta operación se ha realizado mediante el contador de partículas Coulter Counter con un tubo de 30 μm , y diluyendo las muestras en tampón Tris para llevar un número de células en un intervalo entre 500-2000 cel/ μL .

Debido a que el IP se une tanto a DNA como a RNA, debe hacerse un tratamiento previo con DNAasa o RNAasa, según el componente a analizar (Petit y col., 1993). Las etapas a seguir, una vez fijadas las células, son las siguientes:

Digestión con enzimas. Se reparte 1 mL de cada muestra en tubos Eppendorf y se centrifugan a 10000 r.p.m. (18000 g) durante 10 minutos. Se resuspende el precipitado en una disolución de DNAasa 1 mg/mL en Tris 0,1M-NaCl, (pH 7,4) para el análisis de RNA, y en una disolución de RNAasa de 1 mg/mL en Tris 0,1M-NaCl, (pH 7,4) para el de DNA; se agita e incuba a 37 °C durante 40 minutos.

Para la **tinción con IP** primero es necesario centrifugar a 10000 r.p.m. durante 10 minutos para eliminar la enzima. El precipitado se resuspende en una disolución de IP de 0,1 mg/mL en Tris posteriormente se debe agitar y, protegido de la luz, incubar a 4 °C durante 10 minutos.

Para la **lectura fluorescencia** de las muestras teñidas con IP deben emplearse las siguientes condiciones de análisis **en el Espectrofluorímetro**: longitud de onda de excitación de 536 nm y una rendija de 19. Para la emisión se empleó una longitud de onda de 623 nm y una rendija de 5. La temperatura empleada durante el análisis fue de 25° C en todos los casos.

Los valores de fluorescencia obtenidos son convertidos en concentraciones de DNA y RNA por calibrado. Para obtener las curvas correspondientes se realizó el calibrado de la siguiente forma:

Calibrado del Análisis por Fluorimetría para Ácidos Nucleicos

Para el calibrado de DNA y RNA se emplearon, respectivamente, patrones de DNA de timo de bovino y RNA de levadura en un intervalo de concentraciones entre 0,001 a 0,1 mg/mL. Tiñendo con Ioduro de Propidio 0,02 mg/mL, ya que se comprobó que ésta era la concentración de saturación de la disolución de 0,1 mg/mL de DNA y RNA para el IP.

Los resultados obtenidos del ajuste por regresión lineal de los datos de concentración de las disoluciones patrón con los valores de Intensidad de Fluorescencia (IF^F), se muestran en las ecuaciones [2.12] y [2.13]:

$$C_{DNA}^p (g / L) = 3,68 \cdot 10^{-4} \cdot IF^F \cdot FD \quad [2.12]$$

$$C_{RNA}^p (g / L) = 3,46 \cdot 10^{-4} \cdot IF^F \cdot FD \quad [2.13]$$

Siendo IF^F la intensidad de fluorescencia medida en el fluorímetro y FD el factor de dilución de la muestra analizada.

Para el análisis de las muestras en el **Citómetro de Flujo** las condiciones empleadas son: Filtro para la excitación de 488 nm, mientras que para emisión el filtro empleado fue de 600 nm. La fuente de iluminación fue una lámpara de xenon de 75 W.

Una vez preparadas las muestras procedentes del fermentador, siguiendo el protocolo que se ha indicado más arriba, se obtuvieron los **resultados** tanto de su análisis mediante EFM como por CMF.

En el caso del análisis utilizando CMF, se obtiene un histograma por muestra, con una serie de datos estadísticos, como son la media de la intensidad de fluorescencia por célula (Mean) y el coeficiente de variación (CV), además de indicar el número de células por unidad de volumen. Los histogramas obtenidos en el análisis de muestras lo han sido de forma monoparamétrica para cada componente. La abcisa representa la distribución de la señal de fluorescencia en canales y la ordenada el número relativo de células. En la Figura 2.19 se muestra un histograma tipo, de los obtenidos para una muestra analizada mediante CMF. Se muestra en la citada figura un histograma correspondiente a la fluorescencia verde (FL1) que es la fluorescencia emitida por las proteínas teñidas con isotiocianato de fluoresceína. El otro histograma muestra la fluorescencia roja (FL2) que es la fluorescencia emitida por los ácidos nucleicos (DNA y RNA) teñidos con ioduro de propidio. En ambos casos la fluorescencia media por célula aporta el valor Mean, necesario para realizar la cuantificación del componente correspondiente.

Las Figuras 2.20 y 2.21 muestran la evolución de DNA y RNA obtenidas mediante espectrofluorimetría a lo largo de la fermentación. Los datos son expresados en concentración por extrapolación de la intensidad de fluorescencia de acuerdo a las

ecuaciones [2.12] y [2.13], para DNA y RNA, respectivamente. Los resultados obtenidos para los dos ensayos realizados son repetitivos y evitan los problemas encontrados con los métodos basados en la espectrofotometría de absorción.

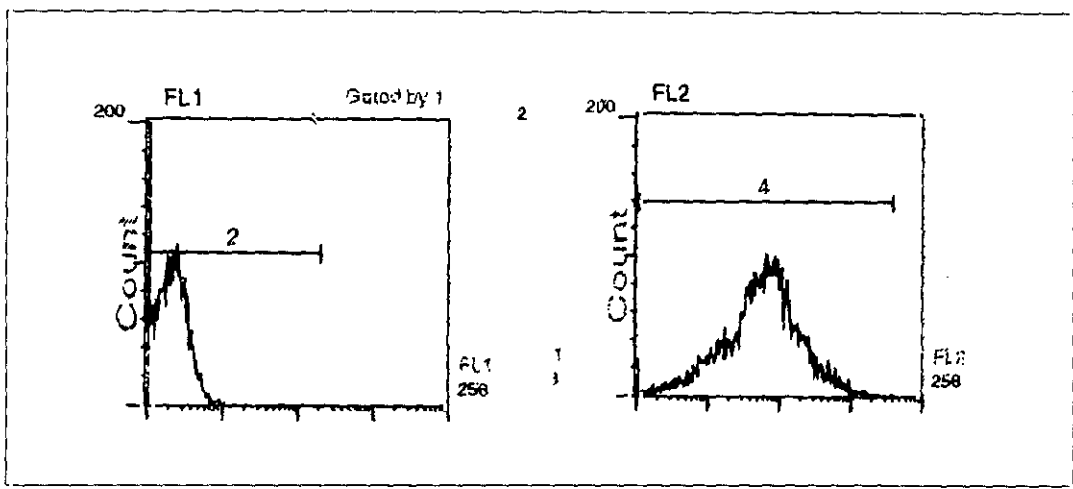
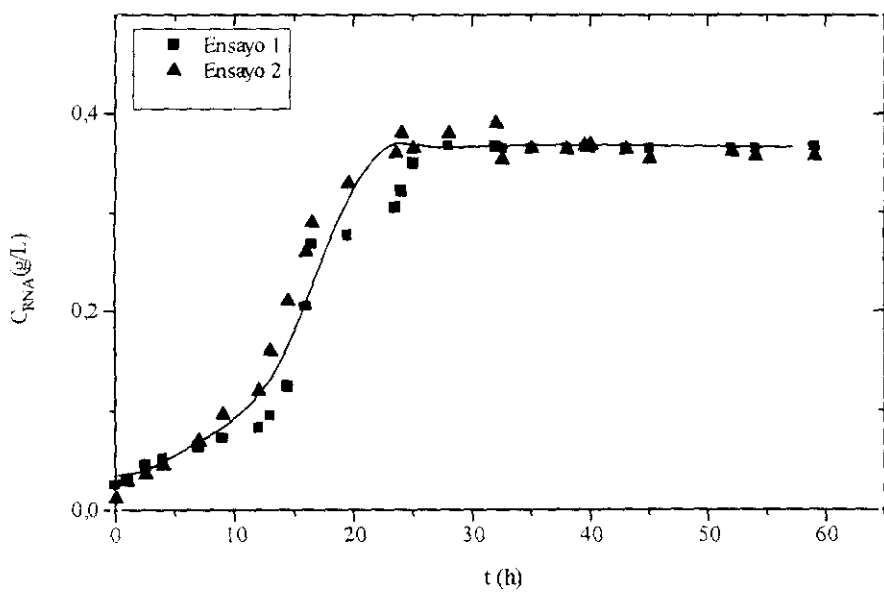


Figura 2.19.- Histograma tipo de una muestra obtenida mediante CMF. FL1 es la fluorescencia verde (proteínas) y FL2 la fluorescencia roja (ácidos nucleicos).



Figuras 2.20.- Evolución de RNA durante la fermentación analizado por Espectrofluorimetría.

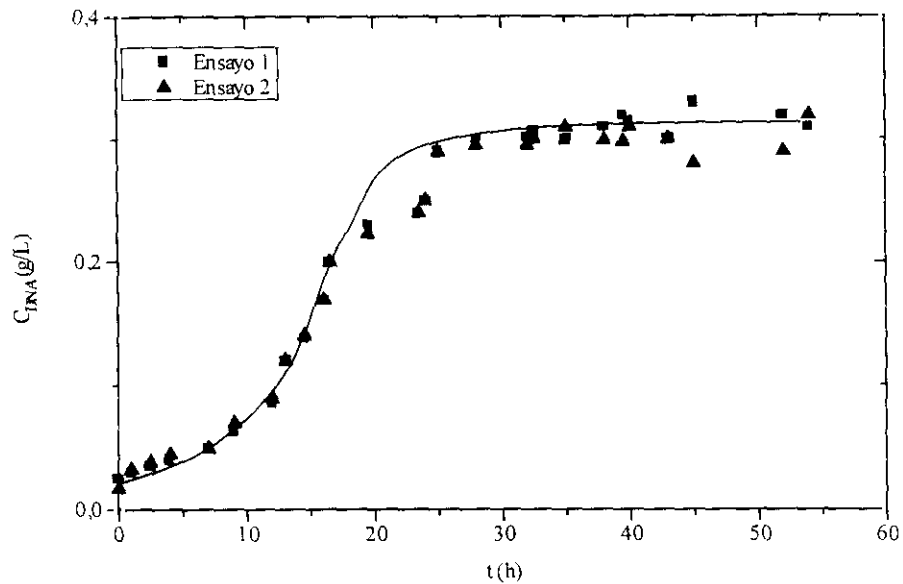


Figura 2.21.- Evolución de RNA durante la fermentación analizado por Espectrofluorimetría.

De lo visto en este apartado para el análisis de ácidos nucleicos mediante técnicas basadas en la medida de la fluorescencia de las células teñidas con IP, se puede concluir que la espectrofluorimetría es una técnica que permite la correcta cuantificación de los componentes intracelulares, dada la repetitividad de los resultados conseguidos en dos análisis de las mismas muestras. Por lo tanto, con esta técnica se pueden obtener resultados fiables para el seguimiento de ácidos nucleicos durante un proceso microbiano. No obstante, ya se comentó anteriormente que, debido a las enormes posibilidades que presenta la Citometría de Flujo frente a otras técnicas, era interesante emplear esta técnica para efectuar el seguimiento de los diferentes componentes intracelulares. Ahora bien, es necesario encontrar la forma de obtener resultados cuantitativos con dicha técnica. Debido a que la fluorimetría rinde resultados fiables para obtener una relación cuantitativa con los datos de intensidad de fluorescencia de la CMF –como hicieron Agar y Bailey (1982)–, se pensó en obtener una relación entre los datos cuantitativos conseguidos mediante espectrofluorimetría y los datos en unidades relativas obtenidos por Citometría de Flujo.

Ya que el protocolo de preparación es idéntico para ambas técnicas, la misma muestra fue analizada utilizando ambos métodos de análisis. La correlación CMF-EFM para DNA y RNA fue realizada mediante el análisis de 50 muestras para cada clase de ácido nucleico. La misma muestra era analizada mediante ambas técnicas en un intervalo de

tiempo no superior a 5 horas, para evitar posibles errores como consecuencia de la pérdida de fluorescencia. Es importante llevar al citómetro muestras con un número de células por unidad de volumen muy similar, prácticamente igual, con el fin de que los histogramas fuesen siempre comparables, por lo que las muestras analizadas tenían todas una concentración celular comprendida entre 200 a 2000 cel/ μ L. Otro aspecto importante a tener en cuenta, a la hora de realizar el calibrado, es el intervalo de concentración de cada tipo de ácido nucleico pues era absolutamente necesario cubrir todo el intervalo que permitiese posteriores análisis, durante todo el ciclo celular de la bacteria. Para ello, las 50 muestras analizadas fueron tomadas durante las diferentes etapas de la fase de crecimiento de *Xanthomonas campestris* y, de esta forma, se obtuvo todo el intervalo de concentración posible. En la Figura 2.22 aparece reflejada la relación entre las medidas conseguidas por CMF y EFM para ácidos nucleicos. Como puede verse en dicha figura, las pendientes obtenidas al representar concentración por célula vs. "mean" son iguales para ambos tipos de ácidos nucleicos, por tanto, el ajuste por regresión lineal se realizó uniendo lo obtenido para el DNA y lo obtenido para el RNA. El resultado de este ajuste aparece reflejado en la ecuación [2.13], en la que es necesario conocer el número de células (NC); este dato, como ya se ha comentado, es obtenido también mediante Citometría de Flujo. El coeficiente de regresión obtenido en este ajuste es $r=0,996$.

$$C_{DNA,RNA}^C (g / L) = 0,11 \cdot IF_{CMF} \cdot FD \cdot NC \quad [2.14]$$

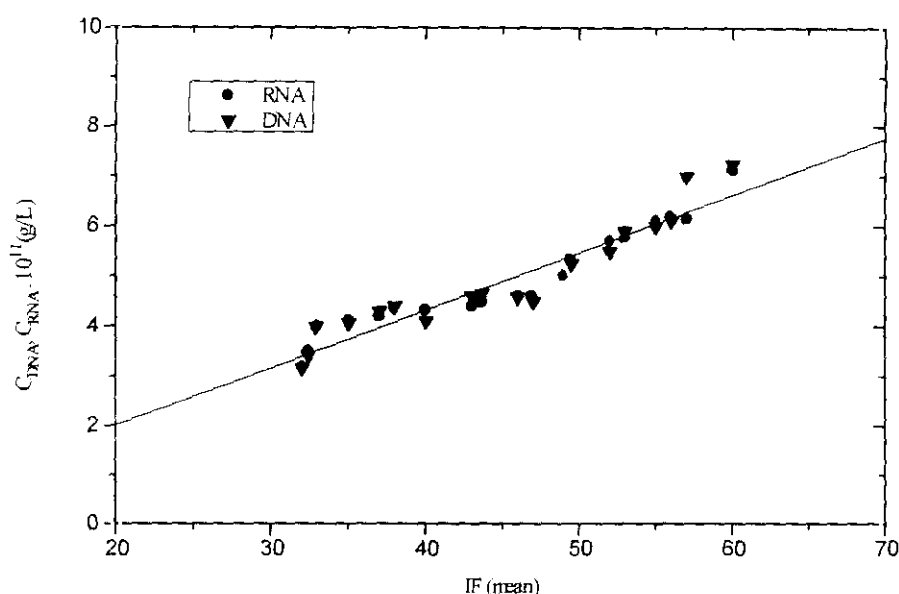


Figura 2.22.- Relación entre IF obtenida CMF y concentración obtenida por EFM

2.6.- MÉTODOS MATEMÁTICOS

Debido a que en la presente Memoria ha sido necesario la aplicación de diferentes técnicas de cálculo, se va a dedicar este apartado a realizar una breve descripción de las mismas.

Las técnicas matemáticas empleadas se pueden dividir en dos grandes grupos: técnicas de estimación de parámetros a partir de datos experimentales (regresión) y técnicas de simulación de la evolución del sistema con las variables estudiadas. Todos los programas de cálculo empleados se han desarrollado para llevar a cabo este trabajo y han sido realizados en FORTRAN 77. A continuación se expone brevemente el fundamento y la forma de aplicación de estas técnicas.

2.6.1.- Técnicas de Estimación de Parámetros

Las técnicas de estimación de parámetros o regresiones se han empleado principalmente en la aplicación a datos experimentales de los modelos cinéticos propuestos, pero han sido necesarias previamente en la obtención de las expresiones de calibrado de las diferentes técnicas de análisis empleadas comentadas anteriormente.

Para la obtención de las ecuaciones de **calibrado de los diferentes métodos de análisis** se ha utilizado en todos los casos **regresiones lineales**, con ordenada en el origen o sin ella, dependiendo del método de análisis empleado. El criterio de optimización empleado ha sido el de los mínimos cuadrados:

$$\sum_{i=1}^N (y_{exp} - y_{teor})^2 \rightarrow \text{mínimo} \quad [2.15]$$

En los casos en los que se ha empleado este tipo de regresión, para describir el grado de ajuste se ha tenido en cuenta el coeficiente de regresión, r .

En el caso de la aplicación de estas **técnicas de regresión a datos experimentales**, en todos los casos se han utilizado **métodos no lineales** basados en el algoritmo de Marquardt (1963). Dependiendo del modelo a aplicar, se ha llevado a cabo el ajuste en

simple-respuesta o en múltiple-respuesta; es decir, se ha ajustado únicamente la evolución de un componente, generalmente debido a que en la expresión que representa su velocidad de producción no aparece ningún otro componente (**simple-respuesta**); o, por el contrario, si las velocidades de producción de varios o todos los componentes clave del sistema están interrelacionadas es necesario llevar a cabo la regresión simultánea de todos los componentes (**múltiple-respuesta**). En este último caso, se hace necesario igualar los residuos de los diferentes componentes, en caso de que los valores de unos componentes respecto a otros presenten diferencias significativas en órdenes de magnitud, es decir, se hace necesario “pesar los residuos” para que todos los valores presenten la misma significación en el algoritmo de regresión, que de nuevo optimiza la suma de los cuadrados de los residuos (ecuación [2.15]).

La obtención de todos los parámetros cinéticos se ha llevado a cabo tanto en términos de velocidades de producción como de velocidades de reacción, empleando siempre el método integral, ya que es el mejor método para llevar a cabo este cálculo cuando se cuenta con datos integrales (evolución de la composición del sistema con el tiempo). En el caso de plantear los modelos cinéticos términos de **velocidades de producción**, es decir, como un conjunto de ecuaciones diferenciales, ha sido necesario acoplar un método numérico de integración de las citadas ecuaciones, debido a que los datos experimentales obtenidos son, como se ha indicado, datos integrales. El método numérico de integración empleado ha sido el algoritmo de Runge-Kutta de cuarto orden, por lo que se ha hecho necesario acoplar este algoritmo en forma de subrutinas a los programas desarrollados para el ajuste de los datos experimentales a cada modelo cinético propuesto. En la Figura 2.23 se puede observar el diagrama de flujo general del programa de regresión no lineal empleado en los diferentes modelos cinéticos ajustados.

Cuando se emplea el método de velocidades de reacción, el ajuste se lleva a cabo en simple-respuesta, empleando como método de integración de las ecuaciones cinéticas el algoritmo de Simpson, siendo necesario, en este caso, acoplar una subrutina con el citado algoritmo al método no lineal de ajuste. En la Figura 2.24 se recoge el diagrama de flujo que resume este método de cálculo.

En el caso de que el ajuste realizado con los modelos cinéticos a los diferentes experimentos llevados a cabo proporcione una evolución lógica de los parámetros que

contienen, se lleva a cabo de nuevo el ajuste de todos los datos de los diferentes experimentos introduciendo, en el lugar de los parámetros del modelo la expresión que corresponda según la evolución observada en los ajustes previos.

En todas las regresiones no lineales llevadas a cabo se han considerado como indicativos de la bondad del ajuste obtenido los siguientes parámetros estadísticos: F de Fischer, indicativo del grado global de ajuste; t de Student, indicativo del grado de ajuste parámetro a parámetro (relacionado con el intervalo de confianza de los parámetros: valores mínimo y máximo proporcionados por el algoritmo de regresión); y SRC o suma de residuos al cuadrado, indicativo de la calidad en la reproducción de los datos experimentales. La comprobación de la bondad del ajuste, en lo referente a los parámetros estadísticos comentados se realiza a partir de la comparación con los valores de los mismos para el 95% de confianza, según el número de parámetros a calcular y el número de datos que se emplean en el ajuste.

2.6.2.- Simulación con los Modelos Cinéticos

Las simulaciones o predicciones que se llevan a cabo con los diferentes modelos a los que se han ajustado los datos experimentales sirven para comprobar qué influencias son capaces de predecir en cada caso. Para ello, únicamente es necesario realizar la integración conjunta de todas las ecuaciones diferenciales que forman las velocidades de producción del modelo cinético del que se trate. Los programas desarrollados para realizar las simulaciones necesitan únicamente el algoritmo de Runge-Kutta de cuarto orden para la integración del modelo y proporcionar los valores de las concentraciones de los diferentes componentes clave del sistema, una vez introducidos los valores de los parámetros a emplear en la simulación, así como los valores de las variables a emplear (temperatura, agitación, caudal de aire, etc.) y los valores de las concentraciones iniciales de los nutrientes y de la biomasa. En la Figura 2.25 se recoge el diagrama de flujo general de los programas empleados para realizar la simulación con los modelos cinéticos.

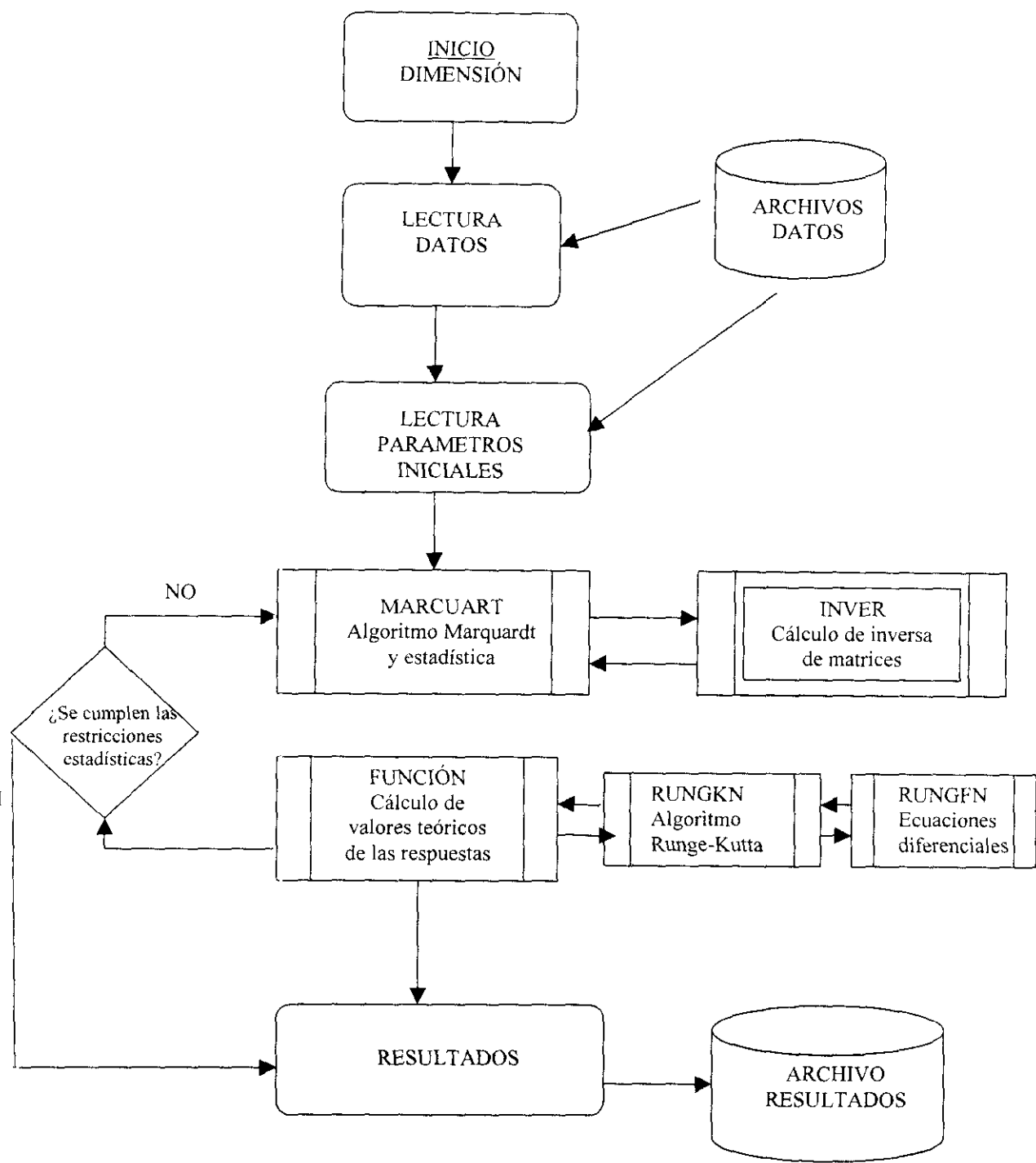


Figura 2.23.- Diagrama de flujo del programa de regresión no lineal en múltiple respuesta empleado basado en el algoritmo de Marquardt (1963).

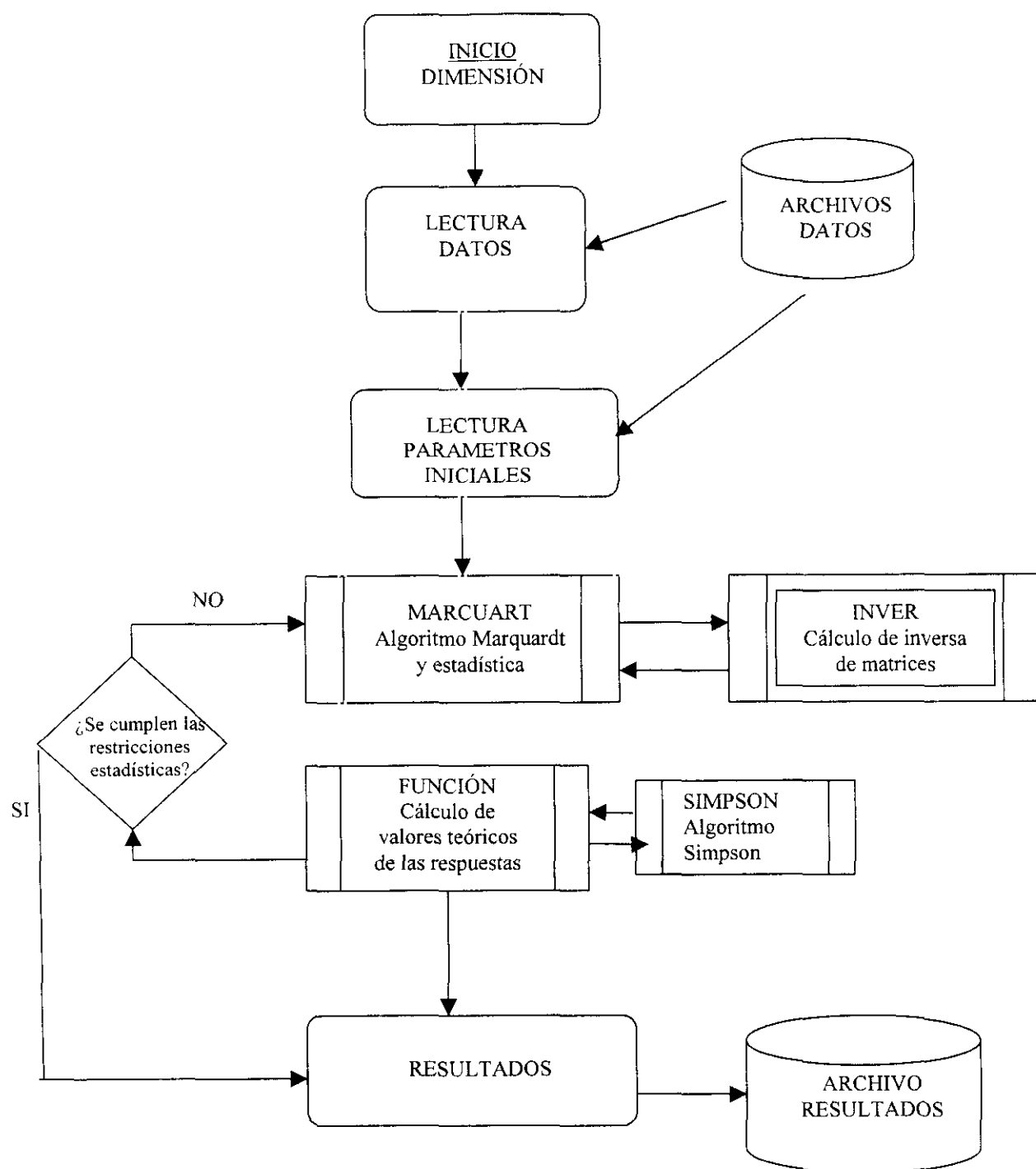


Figura 2.24.- Diagrama de flujo del programa de regresión no lineal en simple respuesta empleando el método en velocidades de reacción con el algoritmo de Marquardt (1963).

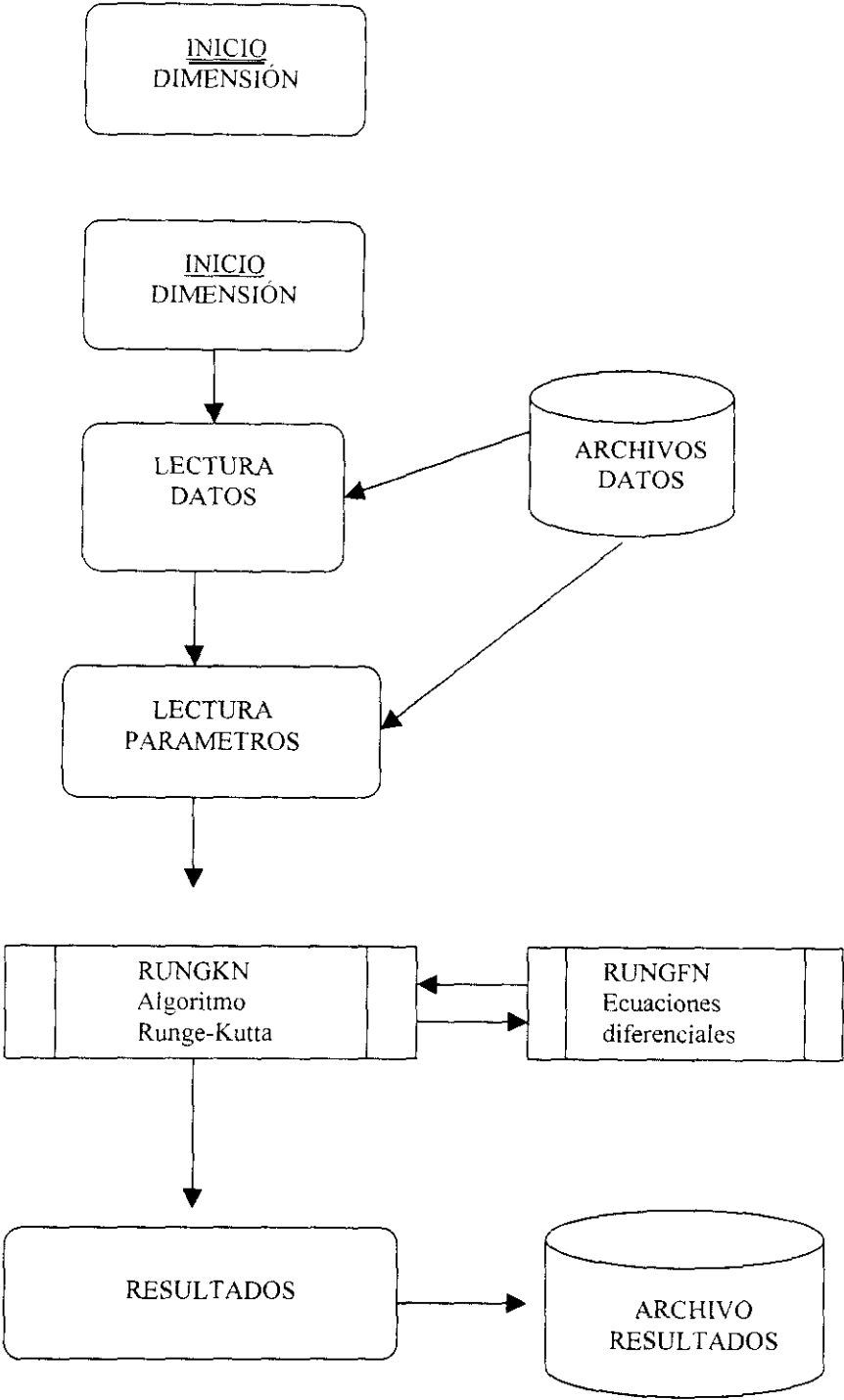


Figura 2.25.- Diagrama de flujo del programa de simulación empleado.

3.- RESULTADOS EXPERIMENTALES

3.- RESULTADOS EXPERIMENTALES

Se han realizado diversos experimentos, en todos ellos utilizando *Xanthomonas campestris* para producir xantano, el polisacárido cuyas propiedades se describieron en la Introducción. En dichos experimentos se han mantenido constantes una serie de condiciones de operación, previamente estudiadas y optimizadas en otros trabajos (Santos, 1993 y García-Ochoa y col., 1997). Estas condiciones de operación son las siguientes:

- **Inóculo**, realizado en una etapa en el medio YM a partir de un cultivo en medio sólido (YM agar) de menos de tres días. El inóculo se incubaba en incubadora orbital durante 12 horas a 28° C.
- **Medio de Producción**: este medio es el denominado Medio A, y que fue descrito en el apartado 2.2.3 de esta Memoria, con el que se consigue un rápido crecimiento de *X. Campestris* y una producción adecuada de xantano (García-Ochoa y col., 1992).
- **pH inicial** de 7,00 dejándolo evolucionar libremente a lo largo de la fermentación.

- **Temperatura**, la optimizada para la producción es de 28° C, si bien se ha experimentado a diferentes temperaturas como 25, 31 y 34 ° C, para tratar de describir la influencia de esta variable con un modelo cinético.
- **Agitación** programada, ya que el extraordinario aumento de viscosidad, debido a la producción del polisacárido, hace que no pueda emplearse una agitación fija. Si la velocidad de agitación es inicialmente muy alta, las bacterias sufren daños celulares, pero si no se sube la agitación cuando aumenta la viscosidad, no se consigue una eficiente velocidad de transporte de oxígeno, y su concentración disminuye hasta cero, lo cual afecta de forma negativa al microorganismo, que es aerobio estricto, y en consecuencia a la producción del polisacárido.

En los experimentos realizados, se han variado dos condiciones de operación:

- **Temperatura**, como ya fue establecido en un trabajo previo (Santos, 1993) la temperatura influye de forma considerable en la producción, por ello se han realizado experimentos a cuatro temperaturas diferentes 25, 28, 31 y 34 ° C.
- **Concentración inicial de nitrógeno**, siempre en forma de amonio, se han realizado experimentos con cuatro valores de concentración de amonio: 65, 130, 257 y 475 p.p.m..

En total se han realizado 7 experimentos, cuyas condiciones se muestran en la Tabla 3.1. La programación de la agitación, aún siendo similar en todos los experimentos, varía, debido a que el aumento de la agitación es realizado según la evolución de oxígeno disuelto en cada caso, y dicha evolución no ha sido igual en los distintos experimentos, pues el cambio de todas estas condiciones lleva a una evolución del sistema bastante diferente.

A la hora de planificar el seguimiento de los distintos componentes del sistema a estudiar, se hizo un planteamiento previo de los modelos cinéticos que iban a ser aplicados de modo que es lógico pensar que para los Modelos Cinéticos No Estructurados, esto es los modelos más sencillos, el número de componentes a analizar sea reducido, mientras que el

número de componentes a seguir y/o analizar aumente con el grado de complejidad del modelo. En los modelos cinéticos más complejos aplicados, los denominados Estructurados o de Célula, es necesario realizar el análisis de componentes intracelulares.

Por ello, desde el principio se realizó el seguimiento y análisis del mayor número de componentes con el fin de aplicar los diferentes tipos de modelos propuestos para los mismos experimentos. Además, todos los experimentos fueron repetidos dos veces con el fin de tener el mayor número de datos a lo largo del tiempo de fermentación. Debido a que el tiempo a que se tomaron algunas de las muestras en las dos fermentaciones realizadas en las mismas condiciones coinciden, los valores obtenidos se presentan como la media entre ambos en la tabla correspondiente. Los resultados de los distintos experimentos se representan en las Tablas 3.2 a 3.8, una para cada experimento.

Tabla 3.1.- Experimentos realizados : condiciones variadas

Experimento	Medio A Concentración NH_4^+ (p.p.m.)	Temperatura (°C)
1	257	25
2	257	28
3	257	31
4	257	34
5	65	28
6	130	28
7	475	28

Tabla 3.2.- Resultados obtenidos en el Experimento n° 1. Condiciones experimentales: 25°C, 257 p.p.m. de amonio inicial y agitación variable (210 r.p.m. iniciales)

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	O ₂ (% sat)	Agitación (r.p.m)	NH ₄ ⁺ (g/L)	Sacarosa (g/L)	Xantano (g/L)	DNA (g/L)	RNA (g/L)	Proteínas (g/L)
0,00	0,010	95,5	210	0,310	40,0	0,33	0,0025	0,0018	0,005
1,00	0,011	86,2	210	0,300	39,9	0,33	0,0027	0,0019	0,005
2,00	0,012	79,8	210	0,290	39,5	0,35	0,003	0,0021	0,006
4,00	0,017	69,0	210	0,270	39,0	0,39	0,0035	0,0031	0,009
5,75	0,028	59,0	210	0,250	38,0	0,40	0,0045	0,0055	0,011
7,75	0,048	55,0	210	0,210	37,8	0,44	0,0082	0,0078	0,020
9,00	0,065	35,0	210	0,190	37,2	0,48	0,011	0,0095	0,021
10,00	0,071	25,0	210	0,180	36,7	0,49	0,019	0,012	0,030
12,00	0,106	15,0	210	0,160	36,9	0,50	0,022	0,019	0,032
16,50	0,350	30,0	350	0,080	36,2	0,89	0,036	0,063	0,089
17,00	0,410	15,0	350	0,070	35,6	0,96	0,070	0,073	0,120
20,00	0,625	8,0	350	0,060	35,2	1,00	0,150	0,108	0,198
24,00	0,780	5,0	350	0,077	35,0	1,20	0,190	0,14	0,260
24,50	0,862	25,0	400	0,073	34,8	1,85	0,210	0,155	0,350
25,00	0,901	18,0	400	0,069	34,0	2,12	0,250	0,162	0,450
25,75	0,930	14,0	400	0,067	33,9	2,20	0,270	0,167	0,460
28,00	0,938	7,0	400	0,055	32,0	2,32	0,290	0,168	0,469
29,00	0,989	20,0	550	0,050	31,0	3,57	0,320	0,178	0,500
29,50	1,222	16,0	550	0,045	30,0	4,44	0,340	0,219	0,600
32,75	1,400	18,0	550	0,035	28,0	5,00	0,349	0,259	0,720
34,75	1,530	13,0	650	0,029	25,5	5,51	0,370	0,270	0,750
35,00	1,560	8,0	650	0,025	24,3	6,05	0,400	0,280	0,780
38,00	1,590	12,0	650	0,022	23,9	7,20	0,420	0,283	0,800
50,00	1,618	11,0	750	0,021	16,9	11,38	0,430	0,288	0,820
50,50	1,620	15,0	750	0,020	16,5	12,38	0,430	0,290	0,830
52,25	1,680	12,0	750	0,020	16,0	13,20	0,430	0,304	0,830
55,00	1,680	16,0	860	0,020	15,9	13,99	0,430	0,306	0,830
56,75	1,680	13,0	860	0,020	15,7	14,26	0,430	0,306	0,830

Tabla 3.3.- Resultados obtenidos en el Experimento n° 2. Condiciones experimentales: 28°C, 257 p.p.m. de amonio inicial y agitación variable (210 r.p.m. inicial)

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	O ₂ (%)	Agitación (r.p.m)	NH ₄ ⁺ (g/L)	Sacarosa (g/L)	Xantano (g/L)	DNA (g/L)	RNA (g/L)	Proteínas (g/L)
0,00	0,070	100,0	210	0,309	36,5	2,19	0,017	0,012	0,035
2,00	0,084	73,0	210	0,300	36,4	2,19	0,031	0,020	0,039
4,00	0,099	59,0	210	0,298	36,0	2,19	0,037	0,021	0,044
7,00	0,130	34,0	210	0,287	36,0	2,19	0,042	0,030	0,050
9,00	0,156	24,0	210	0,280	35,9	2,23	0,049	0,035	0,058
12,00	0,209	16,5	210	0,275	35,7	2,29	0,065	0,042	0,069
13,00	0,229	10,5	210	0,269	35,0	2,33	0,085	0,048	0,089
14,50	0,288	8,0	210	0,266	34,7	2,39	0,120	0,054	0,092
16,00	0,300	5,0	210	0,254	34,0	2,59	0,137	0,081	0,115
16,50	0,350	35,0	310	0,247	33,8	2,62	0,165	0,088	0,129
19,50	0,480	25,0	310	0,220	33,5	2,99	0,199	0,110	0,135
23,50	0,620	15,0	310	0,190	32,9	3,90	0,235	0,149	0,210
24,00	0,663	5,0	310	0,166	32,0	5,82	0,240	0,160	0,250
24,50	0,790	28,0	380	0,140	31,8	6,21	0,250	0,170	0,320
28,00	0,910	19,0	380	0,100	28,7	7,30	0,290	0,199	0,480
32,00	1,220	15,4	380	0,082	26,0	7,59	0,330	0,215	0,600
33,50	1,252	10,2	380	0,073	25,0	7,78	0,335	0,229	0,710
34,00	1,350	24,5	550	0,055	24,0	8,10	0,350	0,230	0,720
38,00	1,400	18,5	550	0,045	23,0	8,40	0,370	0,255	0,760
38,50	1,450	10,0	550	0,025	21,0	8,90	0,375	0,260	0,765
39,50	1,500	5,0	550	0,013	20,2	10,48	0,380	0,265	0,772
41,50	1,548	17,0	650	0,001	18,0	11,20	0,390	0,269	0,775
42,00	1,560	28,0	650	0,000	17,2	12,00	0,395	0,270	0,780
43,75	1,580	21,8	650	0,000	12,0	13,28	0,395	0,270	0,780
48,00	1,580	20,3	750	0,000	10,6	14,90	0,395	0,270	0,780
48,50	1,580	30,0	850	0,000	10,6	15,13	0,395	0,270	0,780
52,00	1,580	28,0	890	0,000	10,6	15,22	0,395	0,270	0,780
59,00	1,580	27,0	890	0,000	10,6	15,20	0,395	0,270	0,780

Tabla 3.4.- Resultados obtenidos en el **Experimento n° 3.** Condiciones experimentales: **31°C, 257 p.p.m.** de amonio inicial y agitación variable (210 r.p.m. inicial).

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	O ₂ (% sat)	Agitación (r.p.m)	NH ₄ ⁺ (g/L)	Sacarosa (g/L)	Xantano (g/L)	DNA (g/L)	RNA (g/L)	Proteínas (g/L)
0,00	0,130	90,0	210	0,220	40,0	0,39	0,012	0,003	0,010
0,50	0,150	59,0	210	0,219	40,0	0,39	0,012	0,004	0,012
1,15	0,158	46,0	210	0,212	40,0	0,39	0,012	0,006	0,014
3,00	0,169	34,1	210	0,200	39,9	0,46	0,013	0,007	0,025
3,50	0,173	23,0	210	0,197	39,9	0,47	0,015	0,010	0,027
6,00	0,199	14,5	210	0,190	39,9	0,53	0,018	0,016	0,050
8,00	0,230	35,0	350	0,189	39,89	0,60	0,021	0,010	0,078
8,50	0,251	22,0	350	0,180	39,80	0,67	0,028	0,021	0,086
9,00	0,304	12,8	350	0,172	39,50	0,87	0,030	0,024	0,095
10,00	0,385	10,0	350	0,170	38,20	0,87	0,032	0,030	0,116
12,00	0,420	6,0	350	0,084	38,00	0,91	0,036	0,033	0,160
14,50	0,550	32,0	450	0,064	36,50	0,99	0,048	0,040	0,230
15,00	0,590	20,0	450	0,057	36,00	1,10	0,067	0,055	0,250
16,00	0,600	12,0	450	0,056	34,00	2,30	0,072	0,065	0,280
18,50	0,680	8,0	450	0,050	33,00	3,20	0,082	0,078	0,320
20,00	0,700	4,0	450	0,048	32,00	3,50	0,100	0,099	0,400
23,50	0,890	22,0	500	0,030	30,00	4,30	0,126	0,116	0,470
24,00	0,900	18,8	500	0,027	29,70	4,80	0,129	0,122	0,500
24,50	0,950	17,0	500	0,025	29,20	5,20	0,130	0,126	0,530
25,00	0,985	10,0	500	0,015	28,30	5,90	0,132	0,129	0,564
26,50	0,990	20,0	580	0,010	27,00	6,20	0,143	0,131	0,580
27,00	1,026	18,0	580	0,000	26,02	7,00	0,145	0,133	0,590
28,00	1,026	15,0	580	0,000	25,60	7,21	0,152	0,138	0,590
30,00	1,073	20,4	700	0,000	25,00	8,07	0,158	0,142	0,590
31,75	1,058	16,3	700	0,000	24,60	8,67	0,160	0,143	0,590
35,00	1,058	15,0	700	0,000	24,20	8,60	0,160	0,143	0,590

Tabla 3.5.- Resultados obtenidos en el Experimento n° 4. Condiciones experimentales: 34°C, 257 p.p.m. de amonio inicial y agitación variable (210 r.p.m. inicial).

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	O ₂ (% sat)	Agitación (r.p.m)	NH ₄ ⁺ (g/L)	Sacarosa (g/L)	Xantano (g/L)	DNA (g/L)	RNA (g/L)	Proteínas (g/L)
0,00	0,045	97,70	210	0,202	40,0	0,94	0,011	0,008	0,020
3,00	0,087	81,00	210	0,175	39,8	0,99	0,021	0,015	0,043
6,00	0,104	70,00	210	0,161	38,9	1,00	0,026	0,019	0,520
9,00	0,122	60,00	210	0,156	38,3	1,13	0,030	0,022	0,061
12,00	0,135	67,50	250	0,148	37,9	1,16	0,033	0,024	0,067
14,00	0,191	50,00	250	0,147	36,8	1,20	0,047	0,034	0,095
14,50	0,200	45,00	250	0,145	35,7	1,30	0,100	0,036	0,102
18,00	0,280	30,00	250	0,143	34,1	1,50	0,070	0,050	0,140
20,00	0,320	29,00	250	0,142	34,2	1,90	0,080	0,057	0,160
24,00	0,407	41,20	280	0,140	33,0	2,05	0,101	0,073	0,203
24,50	0,496	32,30	280	0,139	32,5	2,20	0,124	0,089	0,248
30,00	0,698	28,10	280	0,133	31,4	4,47	0,174	0,125	0,349
33,00	0,739	20,50	280	0,127	30,5	4,98	0,184	0,133	0,369
36,00	0,820	45,00	350	0,125	28,9	5,75	0,205	0,147	0,410
36,50	0,890	40,00	350	0,122	28,0	6,50	0,220	0,160	0,440
40,00	0,950	38,00	350	0,120	27,9	7,50	0,237	0,171	0,475
42,00	1,090	43,00	350	0,119	27,8	8,00	0,272	0,196	0,540
45,00	1,089	42,00	350	0,110	27,5	8,12	0,272	0,196	0,540
48,00	1,089	45,00	350	0,110	27,2	8,12	0,272	0,196	0,540

Tabla 3.6.- Resultados obtenidos en el Experimento nº 5. Condiciones experimentales 28 ° C, 65 p.p.m. de amonio inicial y agitación variable (210 r.p.m. inicial)

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	O ₂ (%)	Agitación (r.p.m)	NH ₄ ⁺ (g/L)	Sacarosa (g/L)	Xantano (g/L)	DNA (g/L)	RNA (g/L)	Proteínas (g/L)
0,00	0,00853	99,80	210	0,0650	40,00	0,402	0,001	0,0008	0,003
1,50	0,00938	93,90	210	0,0620	39,86	0,402	0,002	0,0009	0,004
3,00	0,00980	92,82	210	0,0600	39,68	0,402	0,003	0,001	0,004
4,50	0,0110	91,20	210	0,0550	39,42	0,512	0,005	0,001	0,006
6,00	0,0140	87,30	210	0,0500	39,00	0,618	0,006	0,002	0,007
8,50	0,0330	82,50	210	0,0400	38,63	0,721	0,010	0,003	0,017
12,00	0,0520	72,00	210	0,0330	37,50	0,980	0,012	0,004	0,029
16,00	0,1250	56,00	210	0,0220	36,25	1,230	0,030	0,004	0,073
20,00	0,290	35,00	210	0,0180	35,00	2,700	0,041	0,010	0,142
23,50	0,640	22,10	210	0,0120	34,18	3,520	0,054	0,018	0,258
24,50	0,660	19,10	210	0,010	33,87	4,680	0,056	0,026	0,330
25,25	0,680	45,00	250	0,008	33,654	6,120	0,058	0,030	0,350
26,00	0,690	32,00	250	0,007	33,39	6,850	0,060	0,034	0,372
27,50	0,700	25,00	250	0,005	32,50	7,220	0,065	0,038	0,400
31,00	0,700	19,00	250	0,004	28,00	8,112	0,065	0,038	0,420
32,50	0,700	54,00	400	0,0009	27,55	9,850	0,065	0,038	0,420
33,00	0,700	43,00	400	0,0008	26,25	10,12	0,065	0,038	0,420
35,00	0,700	42,00	400	0,0008	26,00	10,12	0,065	0,038	0,420
40,00	0,700	40,00	400	0,0008	26,00	10,12	0,065	0,038	0,420
40,50	0,700	38,00	400	0,0008	26,00	10,12	0,065	0,038	0,420
43,00	0,700	38,50	400	0,0008	26,00	10,12	0,065	0,038	0,420
47,50	0,700	39,00	400	0,0008	26,00	10,12	0,065	0,038	0,420
50,50	0,700	40,00	400	0,0008	26,00	10,12	0,065	0,038	0,420
55,00	0,700	41,00	400	0,0008	26,00	10,12	0,065	0,038	0,420

Tabla 3.7.- Resultados obtenidos en el Experimento nº 6. Condiciones experimentales 28°C, 130 p.p.m. de amonio inicial y velocidad de agitación variable (210 r.p.m. inicial).

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	O ₂ (% sat)	Agitación (r.p.m)	NH ₄ ⁺ (g/L)	Sacarosa (g/L)	Xantano (g/L)	DNA (g/L)	RNA (g/L)	Proteínas (g/L)
0,00	0,011	100,0	210	0,130	39,7	0,521	0,001	0,001	0,006
2,50	0,015	98,0	210	0,129	39,5	0,521	0,002	0,001	0,008
3,50	0,017	93,0	210	0,129	39,3	0,521	0,002	0,002	0,010
5,50	0,026	86,0	210	0,128	39,0	0,541	0,004	0,003	0,014
7,50	0,027	78,0	210	0,128	38,7	0,561	0,005	0,003	0,015
8,50	0,034	70,0	210	0,127	38,5	0,581	0,006	0,004	0,019
9,25	0,055	67,0	210	0,127	38,0	0,623	0,008	0,006	0,027
10,50	0,075	55,0	210	0,126	37,7	0,792	0,012	0,009	0,032
16,00	0,098	35,0	210	0,120	36,7	1,480	0,015	0,020	0,056
20,00	0,300	26,0	210	0,110	35,9	1,980	0,045	0,036	0,174
24,25	0,580	18,0	210	0,063	34,9	2,350	0,079	0,069	0,336
25,00	0,654	45,0	310	0,044	34,6	2,297	0,082	0,078	0,379
26,50	0,691	33,0	310	0,020	33,3	3,297	0,103	0,083	0,400
28,50	0,703	32,0	310	0,012	32,5	4,016	0,105	0,084	0,405
30,50	0,706	29,0	310	0,009	31,0	5,105	0,105	0,084	0,409
31,50	0,708	25,0	310	0,007	30,2	5,920	0,106	0,085	0,410
32,00	0,709	23,0	310	0,004	29,0	7,080	0,106	0,085	0,413
33,50	0,710	20,0	310	0,003	27,5	8,939	0,106	0,085	0,413
38,00	0,712	19,0	310	0,002	26,0	10,300	0,106	0,085	0,415
45,00	0,712	30,0	450	0,002	24,0	11,200	0,106	0,085	0,415
49,00	0,712	21,0	450	0,002	23,5	11,500	0,106	0,085	0,415
50,00	0,712	19,0	450	0,002	21,7	12,000	0,106	0,085	0,415
51,00	0,712	18,0	450	0,002	21,0	12,900	0,106	0,085	0,415

Tabla 3.8.- Resultados obtenidos en el Experimento n° 7. Condiciones experimentales 28 ° C, 475 p.p.m. de amonio inicial y agitación variable (210 r.p.m. inicial).

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	O ₂ (%)	Agitación (r.p.m)	NH ₄ ⁺ (g/L)	Sacarosa (g/L)	Xantano (g/L)	DNA (g/L)	RNA (g/L)	Proteínas (g/L)
0,00	0,005	100,0	210	0,475	40,00	0,86	0,001	0,001	0,003
1,00	0,006	97,3	210	0,475	38,90	0,86	0,002	0,001	0,004
4,00	0,009	86,5	210	0,475	39,80	0,866	0,003	0,002	0,006
6,00	0,012	80,0	210	0,468	39,70	0,866	0,004	0,003	0,011
7,50	0,022	77,3	210	0,453	39,50	0,86	0,006	0,003	0,015
8,50	0,031	65,0	210	0,445	38,40	0,86	0,009	0,008	0,023
9,50	0,047	55,0	210	0,440	37,90	0,93	0,013	0,011	0,034
12,00	0,068	40,0	210	0,429	37,00	1,02	0,040	0,032	0,065
16,00	0,085	26,0	210	0,400	36,75	1,09	0,063	0,053	0,160
22,50	0,180	10,0	210	0,365	36,00	1,13	0,092	0,079	0,230
23,00	0,214	60,0	310	0,355	35,75	1,32	0,093	0,088	0,245
23,50	0,320	49,6	310	0,320	35,00	1,42	0,098	0,091	0,253
26,00	0,470	35,0	310	0,300	34,50	1,48	0,100	0,092	0,255
29,00	0,608	20,0	310	0,285	34,00	1,51	0,103	0,131	0,350
30,50	0,750	10,0	310	0,231	33,80	1,63	0,125	0,142	0,420
32,50	0,820	8,0	310	0,166	33,00	1,72	0,146	0,152	0,465
34,00	0,850	50,0	350	0,140	29,50	2,58	0,170	0,158	0,467
34,50	0,890	42,0	350	0,135	28,50	3,75	0,173	0,159	0,467
35,00	0,920	30,0	350	0,130	27,70	4,00	0,175	0,160	0,467
42,00	0,990	22,0	350	0,130	26,00	6,90	0,176	0,161	0,467
45,00	0,990	12,0	350	0,130	25,00	9,50	0,176	0,161	0,467
47,50	0,990	8,0	350	0,130	23,20	11,39	0,176	0,161	0,467
50,50	0,990	35,0	400	0,130	23,10	11,39	0,176	0,161	0,467
55,00	0,990	20,0	400	0,130	23,10	11,39	0,176	0,161	0,467

Como ya se comentó en el apartado anterior, Procedimiento Experimental, el xantano se siguió por medida de la viscosidad del caldo, realizando el calibrado al final de cada experimento, pues el xantano producido en las diferentes condiciones de operación empleadas no presenta siempre la misma relación entre concentración y viscosidad. Para cada experimento, las ecuaciones finalmente utilizadas fueron las siguientes:

Para el Experimento nº1:

$$C_p(g/L) = 0,12 \cdot \mu_a^{0,97}(cp) \quad [3.1]$$

Para el Experimento nº 2:

$$C_p(g/L) = 0,34 \cdot \mu_a^{0,70}(cp) \quad [3.2]$$

Para el Experimento nº 3:

$$C_p(g/L) = 0,43 \cdot \mu_a^{0,51}(cp) \quad [3.3]$$

Para el Experimento nº 4:

$$C_p(g/L) = 2,05 \cdot \mu_a^{0,34}(cp) \quad [3.4]$$

Para el Experimento nº 5:

$$C_p(g/L) = 0,77 \cdot \mu_a^{0,32}(cp) \quad [3.5]$$

Para el Experimento nº 6:

$$C_p(g/L) = 0,77 \cdot \mu_a^{0,31}(cp) \quad [3.6]$$

Para el Experimento nº 7:

$$C_p(g/L) = 0,23 \cdot \mu_a^{0,71}(cp) \quad [3.7]$$

La viscosidad aparente del caldo se midió con un viscosímetro BROOKFIELD SINCHRO-ELECTRIC modelo LVT, a una temperatura de 25 °C y a una velocidad de 30 r.p.m.

4.- MODELO CINÉTICO ***NO ESTRUCTURADO***

4.- MODELO CINÉTICO NO ESTRUCTURADO

Los Modelos Cinéticos No Estructurados (MCNE) son los modelos más sencillos empleados para la descripción de sistemas microbianos. La cantidad de microorganismo se expresa mediante el término de biomasa o población microbiana en unidades abstractas de vida, ignorándose la estructura interna del microorganismo o célula que compone la biomasa pues se considera a la población como una unidad homogénea. Como ya ha sido comentado, este tipo de modelos son una gran simplificación del problema real, y suelen ser usados con fines tecnológicos, ya que proporcionan ecuaciones sencillas con sentido físico, en las que se trata al microorganismo como una especie reactante sencilla, aunque para ser útiles deben de describir un número suficiente de componentes del sistema; es decir, a pesar de ser los modelos más simples, requieren la medida de varios componentes que permitan la descripción de, al menos, la evolución de la biomasa, la fuente de carbono, el producto y otros sustratos, como la fuente de nitrógeno.

La producción de xantano ha sido modelizada empleando este tipo de modelos por varios autores (Moraine y Rogovin, 1966 y 1971; Weiss y Ollis, 1980; Quinlan 1986; Pinches y Pallent; 1986; Schweickart y Quinlan, 1989); no obstante, estos autores no tienen en cuenta en sus ecuaciones todos los nutrientes esenciales de este sistema.

Estudios experimentales llevados a cabo en un trabajo previo (Santos, 1993) apuntan claramente la dependencia de la velocidad de crecimiento del microorganismo de las concentraciones de nitrógeno y de oxígeno disuelto en el medio. En la Figura 4.1 se muestran los resultados experimentales obtenidos en el Experimento 2, donde se observan claramente estas dependencias entre nutrientes y crecimiento de microorganismo y formación del producto. El sustrato limitante en este experimento, debido a las condiciones empleadas (28° C, medio A, con 257 p.p.m. de amonio y programación de la velocidad de agitación) es la fuente nitrogenada, de modo que, cuando el amonio se agota, el microorganismo entra en la fase estacionaria del crecimiento. Además, hay que destacar que la concentración de amonio influye en la biomasa final obtenida en cada fermentación, de modo que con concentraciones iniciales de amonio bajas, la biomasa final también lo será; esta proporcionalidad entre biomasa final y concentración inicial de sustrato nitrogenado es cierta hasta un cierto valor de concentración de amonio, ya que para concentraciones por encima de un valor crítico, puede tener un efecto tóxico para la célula.

Debido a que *Xanthomonas campestris* es una bacteria aerobia estricta, el oxígeno disuelto en el medio puede ser un nutriente limitante del crecimiento del microorganismo. No obstante, en este caso, el oxígeno disuelto no actúa de limitante del crecimiento ya que los experimentos han sido realizados con programación de agitación para compensar la bajada de concentración de oxígeno por el consumo de las células en el crecimiento y además por el aumento de la viscosidad en el medio, como consecuencia de la producción de xantano. Como puede apreciarse en la Figura 4.1, su concentración no desciende hasta cero si no que permanece alrededor del 10% del valor de saturación.

En cuanto a la formación de xantano, se puede observar en la misma figura que se trata de un producto asociado al crecimiento, es decir se forma a medida que el microorganismo está creciendo, si bien el incremento mayor de concentración se produce cuando el microorganismo se encuentra en la fase estacionaria del crecimiento. Por otro lado, se observa la estrecha relación entre la formación del producto y el consumo de la fuente carbonada.

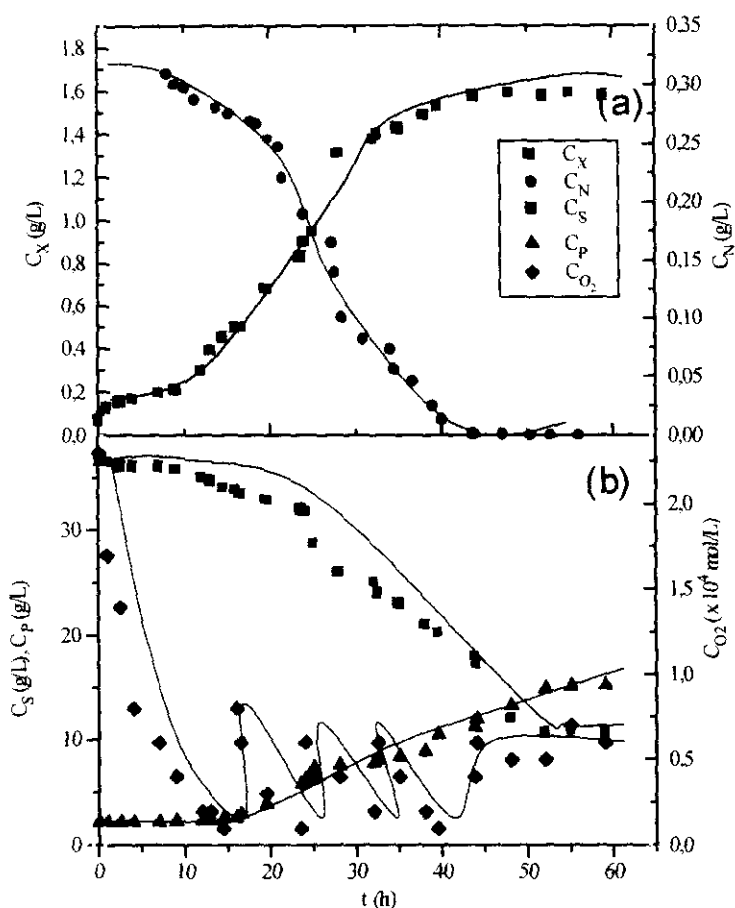


Figura 4.1- Resultados experimentales obtenidos en el experimento n° 2, realizado a 28°C, con 257 p.p.m. de amonio y agitación variable (210 r.p.m inicial).

Se han propuesto varios modelos no estructurados para la modelización de la producción xantano (Moraine y Rogovin, 1966 y 1971; Souw y Demain, 1980; Pinches y Pallent, 1986; De Vuyst y col., 1987a y b). Estos modelos pueden clasificarse en dos grupos:

- Aquellos que consideran el crecimiento y la producción dependientes de diferentes nutrientes.
- Aquellos que expresan el crecimiento y la producción sólo en función de la biomasa y su evolución con el tiempo.

Al primer grupo citado pertenecen los modelos propuestos por Moraine y Rogovin (1966 y 1971), y por Quinlan y colaboradores (Quinlan y col., 1986; Schweickart y Quinlan,

1989). La diferencia entre ellos está en el tipo de ecuaciones cinéticas empleadas para la evolución del crecimiento y la descripción de la producción.

Moraine y Rogovin (1966 y 1971) emplean ecuaciones tipo Monod (Ecuaciones [4.1] y [4.3]), para describir la evolución de xantano y biomasa, considerando el nitrógeno como limitante del crecimiento, ecuación [4.1] y la fuente de carbono limitante para la producción de xantano, ecuación [4.3]. La evolución de los dos sustratos con el tiempo vienen expresados utilizando dos coeficientes estequiométricos (ecuaciones [4.2] y [4.4]) denotados por Y_{PS} e Y_{XN} . Este modelo puede ser expresado por el siguiente sistema de ecuaciones:

$$\frac{dC_X}{dt} = \frac{\mu_m \cdot C_N}{K_N + C_N} \cdot C_X \quad [4.1]$$

$$\frac{dC_S}{dt} = -\frac{1}{Y_{PS}} \cdot \frac{dC_P}{dt} \quad [4.2]$$

$$\frac{dC_P}{dt} = \frac{k_P \cdot C_S}{K_S + C_S} \cdot C_X \quad [4.3]$$

$$\frac{dC_N}{dt} = -\frac{1}{Y_{XN}} \cdot \frac{dC_X}{dt} \quad [4.4]$$

El modelo de Quinlan (1986) y Schweickart y Quinlan (1989) también describen el consumo de nutrientes mediante las ecuaciones [4.2] y [4.4]; sin embargo, la biomasa y la producción de xantano no vienen dadas por ecuaciones tipo Monod, sino potenciales de la forma expresada en las ecuaciones [4.5] y [4.6]:

$$\frac{dC_X}{dt} = k_X \cdot C_N \cdot C_X \quad [4.5]$$

$$\frac{dC_P}{dt} = k_P \cdot C_S \cdot C_X \quad [4.6]$$

Por combinación de las ecuaciones [4.4] y [4.5] se obtiene la ecuación logística:

$$\frac{dC_X}{dt} = k_X \cdot \frac{C_{X_m}}{Y_{XN}} \cdot C_X \cdot \left(1 - \frac{C_X}{C_{X_m}} \right) \quad [4.7]$$

Weiss y Ollis (1980) y Pinches y Pallent (1986) proponen modelos pertenecientes al segundo grupo, es decir, aquellos dependientes solamente de la biomasa y su evolución con el tiempo. Expresan el crecimiento como función de la concentración de biomasa mediante la

ecuación logística, pues esta función presenta una tendencia similar a la curva de crecimiento del microorganismo, ecuación [4.8]. La producción de xantano y el consumo de la fuente de carbono viene dado por ecuaciones tipo Luedeking-Piret (ecuaciones [4.9] y [4.10]). Sin embargo, estos autores no tienen en cuenta la fuente de nitrógeno. Por tanto, este modelo viene expresado por las siguientes ecuaciones:

$$\frac{dC_X}{dt} = \mu_m \cdot C_X \cdot \left(1 - \frac{C_X}{C_{X_m}} \right) \quad [4.8]$$

$$\frac{dC_P}{dt} = m \cdot C_X + n \cdot \frac{dC_X}{dt} \quad [4.9]$$

$$\frac{dC_S}{dt} = -\alpha \cdot C_X - \beta \cdot \frac{dC_X}{dt} \quad [4.10]$$

El modelo de Pinches y Pallent (1986) emplea las mismas ecuaciones para crecimiento, xantano y consumo de la fuente de carbono que el empleado por Weiss y Ollis (1980), pero incluyen la ecuación [4.4] para la evolución de nitrógeno y añaden la ecuación [4.11] para el consumo de oxígeno (sin incluir su transporte), el cual depende de la concentración de biomasa y de la velocidad de crecimiento:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = A \cdot C_X + B \cdot \frac{dC_X}{dt} \quad [4.11]$$

Ninguno de estos autores emplea técnicas de regresión para obtener el valor de los parámetros que aparecen en las ecuaciones anteriores, por el contrario emplean técnicas de estimación por simplificación de ecuaciones en puntos singulares, obteniendo unos valores de los parámetros que proporcionan un ajuste experimental de forma aceptable, aunque solo para un experimento en cada caso.

En la Tabla 4.1 se resumen los modelos cinéticos no estructurados para la producción de xantano en forma diferencial, incluyendo el que se comentará en el próximo apartado. En ella se han considerado los cinco modelos más representativos, así como las cinco respuestas posibles, expresadas en concentraciones másicas (g/L). Sólo dos de estos modelos consideran las cinco respuestas.

Tabla 4.1.- Resumen de los Modelos Cinéticos No Estructurados para la Producción de Xantano.

Autores	C_X	C_S	C_P	C_N	C_{O_2}
Moraine y Rogovin (1966, 1971)	$\frac{dC_X}{dt} = \frac{\mu_m \cdot C_N}{K_N + C_N} \cdot C_X$	$\frac{dC_S}{dt} = -\frac{1}{Y_{PS}} \cdot \frac{dC_P}{dt}$	$\frac{dC_P}{dt} = \frac{k_P \cdot C_S}{K_S + C_S} \cdot C_X$	$\frac{dC_N}{dt} = -\frac{1}{Y_{XN}} \cdot \frac{dC_X}{dt}$	-
Weiss y Ollis (1980)	$\frac{dC_X}{dt} = \mu_m \cdot C_X \cdot \left\{ 1 - \frac{C_X}{C_{Xm}} \right\}$	$\frac{dC_S}{dt} = -\alpha \cdot C_X - \beta \cdot \frac{dC_X}{dt}$	$\frac{dC_P}{dt} = m \cdot C_X + n \cdot \frac{dC_X}{dt}$	-	-
Pinches y Pallent (1986)	$\frac{dC_X}{dt} = \mu_m \cdot C_X \cdot \left\{ 1 - \frac{C_X}{C_{Xm}} \right\}$	$\frac{dC_S}{dt} = -\alpha \cdot C_X - \beta \cdot \frac{dC_X}{dt}$	$\frac{dC_P}{dt} = m \cdot C_X + n \cdot \frac{dC_X}{dt}$	$\frac{dC_N}{dt} = -\frac{1}{Y_{XN}} \cdot \frac{dC_X}{dt}$	$\frac{dC_{O_2}}{dt} = A \cdot C_X + B \cdot \frac{dC_X}{dt}$
Quinlan (1986) y Schweickart y Quinlan (1989)	$\frac{dC_X}{dt} = k_X \cdot C_N \cdot C_X$	$\frac{dC_S}{dt} = -\frac{1}{Y_{PS}} \cdot \frac{dC_P}{dt}$	$\frac{dC_P}{dt} = k_P \cdot C_S \cdot C_X$	$\frac{dC_N}{dt} = -\frac{1}{Y_{XN}} \cdot \frac{dC_X}{dt}$	-
Santos (1993)	$\frac{dC_X}{dt} = k_m \cdot \left\{ \frac{C_{Xm}}{Y_{XN}} + C_{Xp} \right\} \cdot C_X \cdot \left[1 - \frac{C_X}{C_{Xm} + Y_{XN} \cdot C_{Xp}} \right]$	$\frac{dC_S}{dt} = -m \cdot C_X - \frac{1}{Y_{XS}} \cdot \frac{dC_X}{dt}$	$\frac{dC_P}{dt} = k_P \cdot C_S \cdot C_X$	$\frac{dC_N}{dt} = -\frac{1}{Y_{XN}} \cdot \frac{dC_X}{dt}$	$\frac{dC_{O_2}}{dt} = K_{La} \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) - \left(\frac{1}{Y_{O_2}} \cdot \frac{dC_X}{dt} \right) - m_{O_2} \cdot C_X$

4.1.- FORMULACIÓN DEL MODELO

En trabajos previos (Santos, 1993 y García-Ochoa y col., 1995) se ha propuesto un MCNE para la producción de xantano. En este modelo se tienen en cuenta las dependencias del crecimiento y la producción de nutrientes, incluyendo una expresión para describir la evolución de otro nutriente esencial en el sistema: el oxígeno disuelto.

El crecimiento del microorganismo viene dado mediante la ecuación logística, la cual es obtenida por combinación de las ecuaciones [4.4] y [4.5].

Los resultados experimentales, obtenidos en un trabajo previo (Santos, 1993, García-Ochoa y col., 1997), muestran claramente que cuando la fuente de nitrógeno es el sustrato limitante, el parámetro C_{xm} puede ser reemplazado por:

$$C_{xm} = C_{X_0} + Y_{XN} \cdot C_{N_0} \quad [4.12]$$

Si la ecuación [4.12] es sustituida en la ecuación [4.7], se obtiene la ecuación logística en forma diferencial :

$$\frac{dC_x}{dt} = k_x \cdot \left(\frac{C_{X_0} + C_{X_0}}{Y_{XN}} \right) \cdot C_x \cdot \left(1 - \frac{C_x}{C_{X_0} + Y_{XN} \cdot C_{N_0}} \right) \quad [4.13]$$

Esta última ecuación tiene en cuenta tanto el crecimiento como el consumo de la fuente nitrogenada. El consumo de la fuente de carbono se expresa teniendo en cuenta que es utilizada tanto para mantenimiento como para crecimiento, incluyendo en "crecimiento" la producción de xantano, puesto que el polisacárido es, en realidad, la cápsula bacteriana, de acuerdo a la ecuación [4.14]:

$$\frac{dC_s}{dt} = -m_s \cdot C_s - \frac{1}{Y_{XS}} \cdot \frac{dC_x}{dt} \quad [4.14]$$

La integración de esta última ecuación, con la condición de contorno, $t=0 \therefore C_s = C_{s0}$ proporciona la siguiente expresión:

$$C_S = C_{S_0} - m_S \cdot \frac{C_{X_0} + Y_{XV} \cdot C_{N_0}}{k_X \left(\frac{C_{X_0}}{Y_{XV}} + C_{N_0} \right)} \cdot \ln \left[1 - \left(\frac{C_X}{C_{X_0} + Y_{XV} \cdot C_{N_0}} \right) \right] \cdot \left[1 - \exp \left(k_X \cdot \left(\frac{C_{X_0}}{Y_{XV}} + C_{N_0} \right) \cdot t \right) \right] \quad [4.15]$$

$$\cdot \left[1 - \exp \left(k_X \cdot \left(\frac{C_{X_0}}{Y_{XV}} + C_{N_0} \right) \cdot t \right) \right] - \frac{1}{Y_{XS}^{max}} \cdot (C_X - C_{X_0})$$

La producción de xantano se expresa mediante la ecuación [4.6] (Quinlan, 1986; Schweikart y Quinlan, 1989) y la evolución de oxígeno disuelto se describe mediante la Ecuación [4.16]:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = k_L a_V \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) - \left(m_{O_2} \cdot C_X + \frac{1}{Y_{O_2, X}} \cdot \frac{dC_X}{dt} \right) \quad [4.16]$$

Esta ecuación [4.16] incluye un término para la transferencia de oxígeno desde el gas y otro para el consumo de oxígeno - tanto para mantenimiento como para crecimiento- tal y como fue propuesto por Pinches y Pallent (1986). Para ello, es necesario emplear una expresión para el coeficiente de transferencia de oxígeno, para lo cual se ha utilizado la expresión dada en la ecuación [4.17] (Gómez, 1995):

$$k_L a_V = 3,08 \cdot 10^{-4} \cdot V_S^{0,43} \cdot N^{1,75} \cdot \mu^{-0,39} \quad [4.17]$$

Sustituyendo la ecuación [4.15] en la ecuación [4.6] se puede expresar la velocidad de producción de xantano de acuerdo a la ecuación [4.18]:

$$\frac{dC_P}{dt} = k_P \cdot C_X \cdot C_{S_0} - k_P \cdot C_X \cdot m_S \cdot \frac{C_{X_0} + Y_{XV} \cdot C_{N_0}}{k_X \left[\frac{C_{X_0}}{Y_{XV}} + C_{N_0} \right]} \quad [4.18]$$

$$\ln \cdot \left[1 - \frac{C_X}{C_{X_0} + Y_{XV} \cdot C_{N_0}} \left[1 - \exp \left(k_X \left(\frac{C_{X_0}}{Y_{XV}} + C_{N_0} \right) \cdot t \right) \right] \right] - \frac{k_P \cdot C_X}{Y_{XS}^{max}} \cdot (C_X - C_{X_0})$$

En la expresión anterior se identifican tres sumandos, el primero expresa la producción máxima de xantano a cada tiempo, alcanzable si el sustrato carbonado se empleara únicamente en dicha producción; el segundo término expresa la cantidad de fuente carbonada equivalente a la cantidad de xantano desviado para mantenimiento de las células en estado viable; el tercer sumando indica la cantidad de xantano no producida a cada tiempo, debida al consumo de sustrato carbonado para la formación de masa celular, es decir, empleada en el crecimiento.

Por tanto, el modelo consta de siete parámetros, los representativos de la biomasa, que en este caso son k_x e Y_{XN} , y los parámetros correspondientes a la evolución del azúcar, el xantano y el oxígeno disuelto: m_s , Y_{XS} , k_p , m_{O_2} e Y_{O_2X} .

4.2.- AJUSTE DE LOS DATOS EXPERIMENTALES

La aplicación del modelo a los datos experimentales, para el cálculo de los parámetros citados, se tuvo que realizar de la siguiente forma:

- Primero se obtienen los valores de k_x e Y_{XN} , representando el primero la velocidad de crecimiento y el segundo la concentración máxima alcanzable de biomasa a partir de la cantidad de sustrato nitrogenado inicial empleado y la cantidad inicial de biomasa al principio de la reacción. La obtención de estos parámetros se ha llevado a cabo mediante regresión no lineal en simple respuesta acoplada al algoritmo de Runge-Kutta, aplicada a la ecuación [4.13].
- Una vez calculados estos parámetros (k_x e Y_{XN}), son sustituidos en la ecuación [4.13], empleándose, junto con las ecuaciones [4.14] y [4.16], para el cálculo de los parámetros m_s , Y_{XS} y k_p , por aplicación de una regresión no lineal en multi-respuesta acoplada al algoritmo de Runge-Kutta de cuarto orden (para la integración de las ecuaciones diferenciales sin integración analítica posible).

• El cálculo de los parámetros m_{O_2} y Y_{O_2X} se realiza aplicando una regresión no lineal simple-respuesta al conjunto de ecuaciones diferenciales formado por las expresiones [4.14], [4.16], [4.17] y [4.18] sustituyendo los valores de los parámetros calculados hasta el momento en las tres primeras ecuaciones citadas, siendo, por tanto, los únicos parámetros a calcular m_{O_2} e Y_{O_2X} . En este caso, al igual que con la biomasa, no se aplica la regresión en múltiple respuesta, debido al menor peso que en la minimización de la suma de residuos presentaría la ecuación de evolución de oxígeno.

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = k_L a_V (C_{O_2}^* - C_{O_2}) - \left(\frac{1}{Y_{O_2X}} \cdot \frac{dC_X}{dt} \right) - m_{O_2} \cdot C_X \quad [4.19]$$

En la ecuación [4.16], correspondiente a la correlación del coeficiente volumétrico de oxígeno en el proceso, es necesario sustituir la ecuación correspondiente de calibrado de la concentración de xantano en función de la viscosidad para cada experimento. Por otro lado, el cálculo de las concentraciones de oxígeno disuelto en cada momento en términos de moles/L, se realiza empleando la expresión:

$$C_{O_2} (\text{mol} / \text{L}) = 2,3 \cdot 10^{-6} \cdot C_{O_2} (\%) \quad [4.20]$$

En la que se ha supuesto que la concentración de saturación de oxígeno disuelto en las condiciones de trabajo es de $2,3 \cdot 10^{-4}$ mol/L (correspondiente a 28°C y 1 atm).

En las Tablas 4.2 a la 4.8 se recogen los valores calculados de los parámetros físicos y estadísticos obtenidos de la aplicación del Modelo Cinético No Estructurado a los datos de los experimentos realizados (experimentos del 1 al 7). Así mismo, las Figuras 4.2 a 4.8 muestran la reproducción de los datos experimentales con el MCNE aplicado. En todas las figuras, la línea continua corresponde a los valores proporcionados por el modelo MCNE, y los símbolos a los datos experimentales obtenidos del análisis de los diferentes componentes durante la fermentación.

La Tabla 4.2 muestra los parámetros obtenidos del ajuste del **experimento n° 1**, realizado a **25° C** y con **257 p.p.m de amonio inicial**, todos los valores de los parámetros cumplen las restricciones estadísticas, esto es, ninguno incluye el cero en sus intervalos de confianza y se observa que los valores obtenidos de la *t* de Student más bajos corresponden a los parámetros obtenidos del ajuste de la concentración de oxígeno (m_{O_2} , $Y_{O_2,X}$), y los valores más altos, a los obtenidos del ajuste de la concentración de azúcar (m_S , Y_{XS} y k_P). En la Figura 4.2-a, se muestra el ajuste de la evolución de la biomasa a la ecuación logística, donde se observa la buena reproducción de los datos experimentales a esta función; sin embargo, en la misma gráfica se muestran los resultados obtenidos en el ajuste de la evolución del nitrógeno, donde puede observarse que este modelo es incapaz de predecir una buena evolución de este componente. En cuanto a la evolución del resto de componentes, tanto la evolución de la sacarosa y como la del xantano son buenos, mientras que para el oxígeno no se consigue un buen ajuste (Figura 4.2-b).

Los parámetros obtenidos del ajuste al MCNE del **experimento n° 2** realizado a **28° C** y con **257 p.p.m de amonio inicial**, son recogidos en la Tabla 4.3, donde se puede observar que los intervalos de confianza de los parámetros obtenidos del ajuste al MCNE no incluyen el cero y que, al igual que en el experimento anterior, se observan unos valores muy bajos de la *t* de Student para los parámetros correspondientes a la evolución de oxígeno disuelto, quedando reflejado en la mala reproducción de este componente, tal como muestra la Figura 4.3-b; mientras que para las concentraciones de sacarosa y xantano los resultados del ajuste son buenos. En la Figura 4.3-a se muestra la excelente reproducción de la concentración de la biomasa con la ecuación logística, mientras que la reproducción de la evolución del amonio de nuevo es defectuosa, aunque es mejor que la obtenida en el experimento anterior. Se reproduce bien el consumo de la fuente nitrogenada durante la fase exponencial, no siendo bueno el ajuste en la fase estacionaria del crecimiento.

En la Tabla 4.4 aparecen reflejados los parámetros físicos y estadísticos obtenidos por ajuste de los datos del **experimento n° 3** realizado a **31° C** y con **257 p.p.m de amonio inicial** al MCNE, donde vuelve a observarse que, aunque los valores son significativos, los valores de la *t* de Student obtenidos para $m_{O_2,X}$ e $Y_{O_2,X}$ son muy bajos, quedando esto reflejado en la mala reproducción de la concentración de oxígeno (Figura 4.4-b), si bien hay que comentar que, en comparación a los dos experimentos anteriores, la reproducción de los

datos experimentales es algo mejor. En la Figura 4.4-a se muestra la reproducción de los valores experimentales de la biomasa y de la concentración de amonio, siendo los resultados muy similares a los observados en los casos anteriores, es decir, un buen ajuste para la biomasa y peor para la evolución de la fuente nitrogenada.

Los parámetros obtenidos para el **experimento n° 4** realizado a **34° C** y con **257 p.p.m de amonio inicial** se recogen en la Tabla 4.5-a. Se puede observar que al realizar el ajuste de este experimento al MCNE el valor obtenido del parámetro m_s es negativo, lo que indicaría que a esta temperatura este parámetro no tiene influencia y, fisiológicamente, que el microorganismo no consume azúcar para su mantenimiento. Para poder realizar el ajuste posterior de la evolución del oxígeno en simple respuesta, es necesario emplear los parámetros m_s , Y_{XS} y k_p obtenidos del ajuste en múltiple-respuesta del xantano y la sacarosa. Debido a que no es posible introducir un valor de m_s negativo, se volvió a realizar el ajuste fijando m_s en valor cero, obteniéndose así nuevos valores de Y_{XS} y k_p , los cuales se muestran en la Tabla 4.5-b. Estos nuevos valores de los parámetros fueron utilizados para la obtención de los correspondientes para el oxígeno disuelto. Las restricciones estadísticas se cumplen para todos los parámetros, los intervalos de confianza son estrechos, siendo algo más amplios para el parámetro Y_{O_2X} , parámetro que a su vez presenta un valor de la t de Student muy bajo, reflejándose en la mala reproducción de los datos experimentales de la evolución de la concentración de oxígeno disuelto que se muestra en la Figura 4.5-b. En cuanto a la reproducción de la biomasa, es buena, no siendo así para la evolución del amonio, tal como muestra la Figura 4.5-a.

En la Tabla 4.6 se muestran los resultados obtenidos de la aplicación del MCNE al **experimento n° 5** realizado a **28 °C** y con **65 p.p.m. de amonio** inicial. Los intervalos de confianza para los parámetros correspondientes al ajuste de la concentración de oxígeno son muy amplios, presentando un valor de la t de Student bajos, estando el parámetro Y_{O_2X} prácticamente en el límite del valor teórico, tabulado para un 95% de confianza. La Figura 4.6-a muestra la buena reproducción de la biomasa con la ecuación logística, mientras que la evolución de nitrógeno, muestra un mal resultado en cuanto a la reproducción de los resultados experimentales. En la Figura 4.6-b aparece el ajuste de la evolución de xantano y de sacarosa, en los que el resultado es aceptable, mientras que para la concentración de oxígeno la reproducción obtenida no es suficientemente buena.

La aplicación del MCNE al **experimento n° 5** realizado a **28 ° C** y con **130 p.p.m.** de amonio inicial proporciona los parámetros presentados en la Tabla 4.7. Para todos los parámetros se cumplen las restricciones estadísticas impuestas, es decir ningún parámetro incluye el cero, obteniéndose los menores valores de t para el parámetro $Y_{O_2,X}$. Esto último se refleja en la mala reproducción de la evolución del oxígeno, la cual aparece en la Figura 4.7-b. Para la concentración de sacarosa y la concentración de xantano de nuevo se obtiene un buen ajuste. En la Figura 4.7-a, se observa cómo la evolución de la biomasa es perfectamente reproducida por la ecuación logística. En cuanto a la concentración de amonio, parece que la reproducción, obtenida por ajuste de los datos experimentales al MCNE, es buena para este experimento, tal como se observa en la Figura 4.7-a.

Por último, la Tabla 4.8 muestra los valores físicos y estadísticos obtenidos por ajuste a este modelo para el **experimento n° 6** realizado a **28 ° C** y con **475 p.p.m. de amonio**. Tanto los parámetros representativos de la biomasa, como los correspondientes a la sacarosa y xantano cumplen las restricciones estadísticas impuestas. El parámetro $m_{O_2,X}$ proporciona un valor que incluye el cero, obteniéndose un valor de la t de Student que está por debajo del tabulado. En cuanto al parámetro $Y_{O_2,X}$, posee un valor de t de Student muy bajo, prácticamente en el límite del valor tabulado al 95% de confianza. La evolución de oxígeno disuelto (Figura 4.8-b) obtenida de este ajuste, al igual que en todos los experimentos anteriores, no es buena, sin embargo, también como en casos anteriores, la reproducción obtenida para evolución de sacarosa y xantano es aceptable. La reproducción de la evolución de la concentración de biomasa (Figura 4.8-a) de este experimento, al igual que en todos los anteriores, es muy buena. En cambio, para la evolución del amonio, la reproducción obtenida no se corresponde bien con los valores experimentales, tal como se ha ido viendo en el ajuste del resto de los experimentos.

Tabla 4.2.- Parámetros físicos y estadísticos obtenidos por ajuste de los resultados del **experimento n° 1** al MCNE, realizado con *Xanthomonas campestris* a la temperatura de **25° C**, medio A (257 p.p.m. de amonio), programación de agitación (210 r.p.m. inicial).

T (°C)	Parám.	Valor del Parámetro			t Student		F Fischer		SRC
		Máx.	Ópt.	Mín.	Obtenido	Tabulado (95%)	Obtenido	Tabulado (95 %)	
25	k_X	0,825	0,802	0,778	69,91	2,056	2460	3,37	0,157
	Y_{XN}	6,667	6,402	6,173	53,42				
	m_s	0,262	0,258	0,254	127,9	2,060	168,6	2,99	$3 \cdot 10^3$
	Y_{XS}	0,1337	0,1332	0,1320	540,5				
	k_P	0,0129	0,0119	0,0109	23,65				
	m_{O_2}	$2,51 \cdot 10^{-3}$	$2,17 \cdot 10^{-3}$	$1,83 \cdot 10^{-3}$	13,12	2,056	114,7	3,37	$3 \cdot 10^{-8}$
	Y_{O_2X}	19,12	15,72	12,32	9,50				

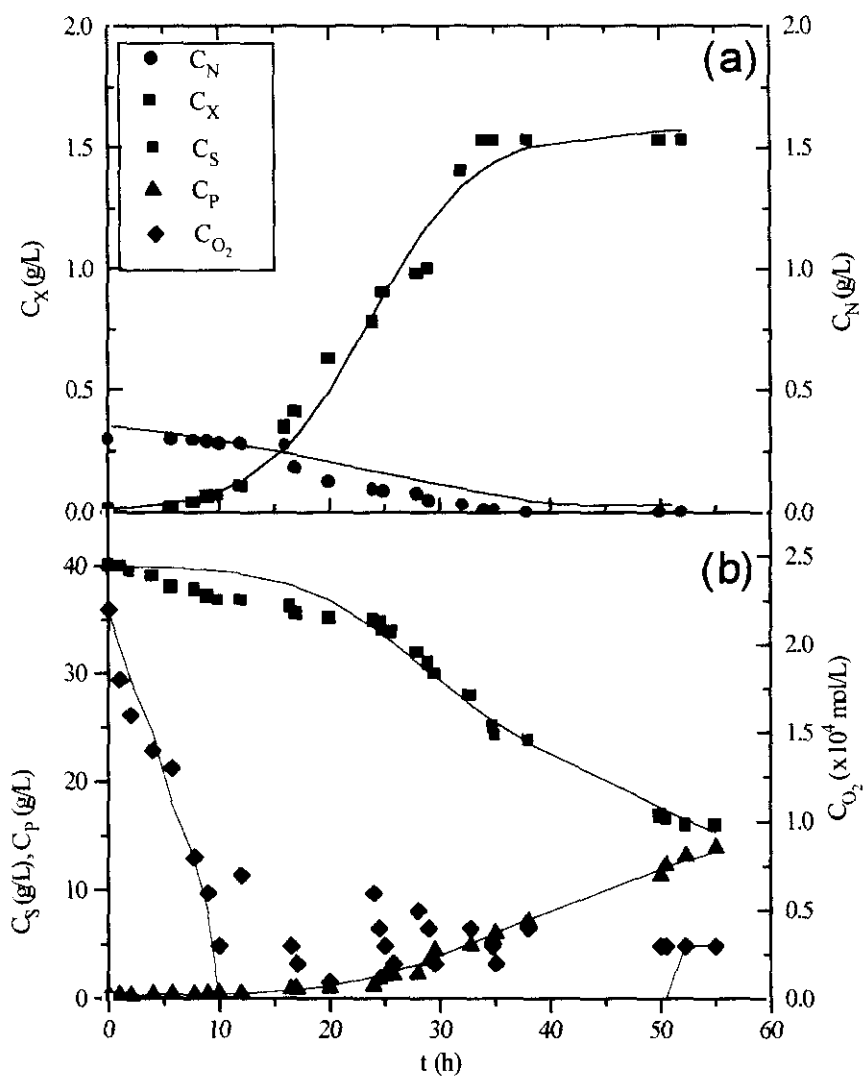


Figura 4.2- Ajuste de los datos experimentales del **experimento n° 1** al MCNE, realizado con *Xanthomonas campestris* a la temperatura de **25° C**, **257 p.p.m.** de **amonio** y programación de agitación (210 r.p.m. inicial).

(a) Evolución de biomasa y amonio

(b) Evolución de xantano, azúcar y oxígeno disuelto

Tabla 4.3.- Parámetros físicos y estadísticos obtenidos por ajuste de los resultados del **experimento n° 2** al MCNE, realizado con *Xanthomonas campestris* a la temperatura de **28° C**, medio A (257 p.p.m. de amonio), programación de agitación (210 r.p.m. inicial).

T (°C)	Parám.	Valor del Parámetro			t Student		F Fischer		SRC
		Máx.	Ópt.	Mín.	Obtenido	Tabulado (95%)	Obtenido	Tabulado (95%)	
28	k_x	0,551	0,535	0,519	68,77	2,060	6984	3,38	$5 \cdot 10^{-2}$
	Y_{XN}	6,229	6,073	5,918	80,26				
	m_s	0,420	0,416	0,412	228,9	2,064	157,2	3,01	$2 \cdot 10^3$
	Y_{XS}	0,140	0,139	0,138	384,0				
	k_p	0,0156	0,0147	0,0137	30,79				
	m_{O_2}	$2,54 \cdot 10^{-3}$	$2,02 \cdot 10^{-3}$	$1,41 \cdot 10^{-3}$	6,74	2,060	41,96	3,38	$2 \cdot 10^{-8}$
	Y_{O_2X}	14,93	10,86	6,80	5,50				

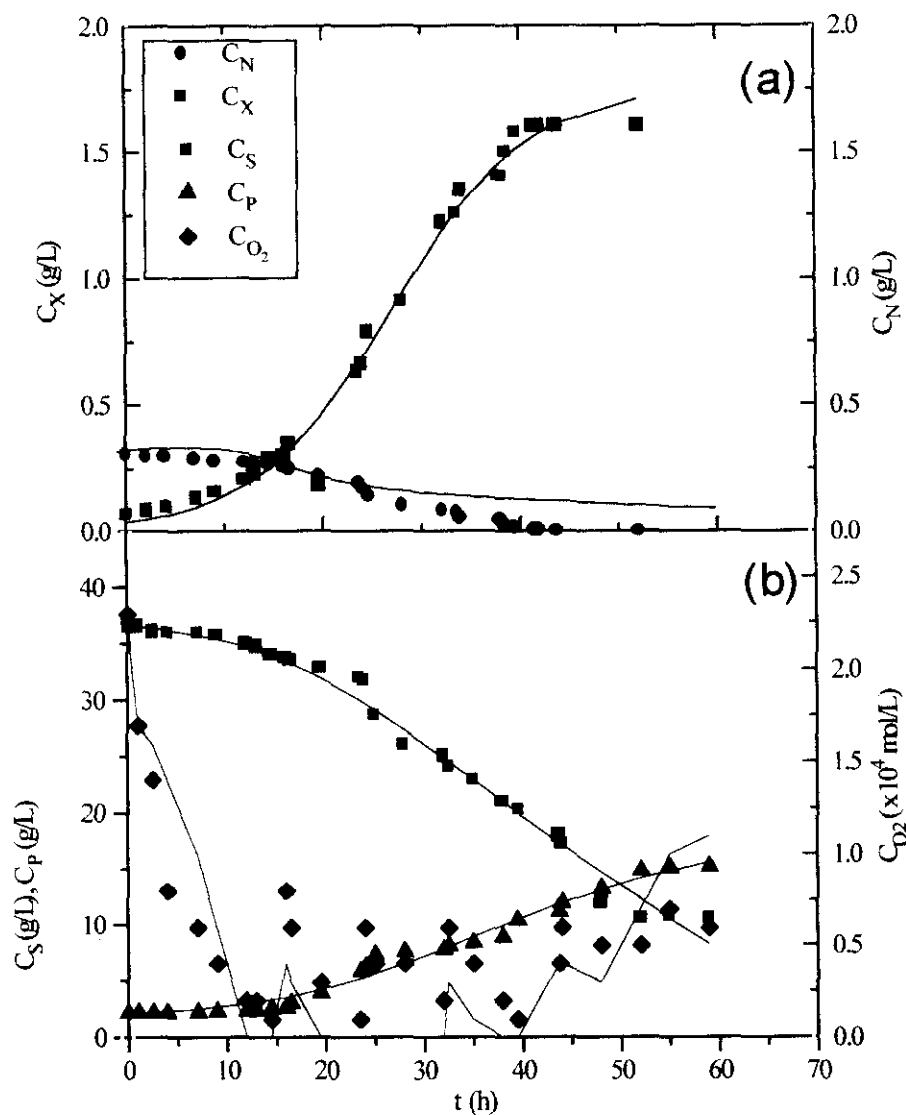


Figura 4.3- Ajuste de los datos experimentales del **experimento n° 2** al MCNE, realizado con *Xanthomonas campestris* a la temperatura de 28° C, medio A (257 p.p.m. de amonio), programación de agitación (210 r.p.m. inicial).

(a) Evolución de biomasa y amonio

(b) Evolución de xantano, azúcar y oxígeno disuelto

Tabla 4.4.- Parámetros físicos y estadísticos obtenidos por ajuste de los resultados del **experimento n° 3** al MCNE, realizado con *Xanthomonas campestris* a la temperatura de **31° C**, medio A (257 p.p.m. de amonio), programación de agitación (210 r.p.m. inicial).

T (°C)	Parám.	Valor del Parámetro			t Student		F Fischer		SRC
		Máx.	Ópt.	Mín.	Obtenido	Tabulado (95%)	Obtenido	Tabulado (95%)	
31	k_X	0,472	0,446	0,421	36,71	2,064	4142	3,40	$3 \cdot 10^{-2}$
	Y_{XN}	4,652	4,325	0,394	27,29				
	m_s	0,468	0,454	0,440	65,08	2,069	155,3	3,03	$2 \cdot 10^3$
	Y_{XS}	0,151	0,149	0,148	184,2				
	k_p	0,0134	0,0126	0,0117	29,69				
	m_o	$1,69 \cdot 10^{-3}$	$1,41 \cdot 10^{-3}$	$1,12 \cdot 10^{-3}$	10,23	2,064	122,2	3,40	$1 \cdot 10^{-3}$
	$Y_{O:X}$	27,36	23,77	20,20	13,71				

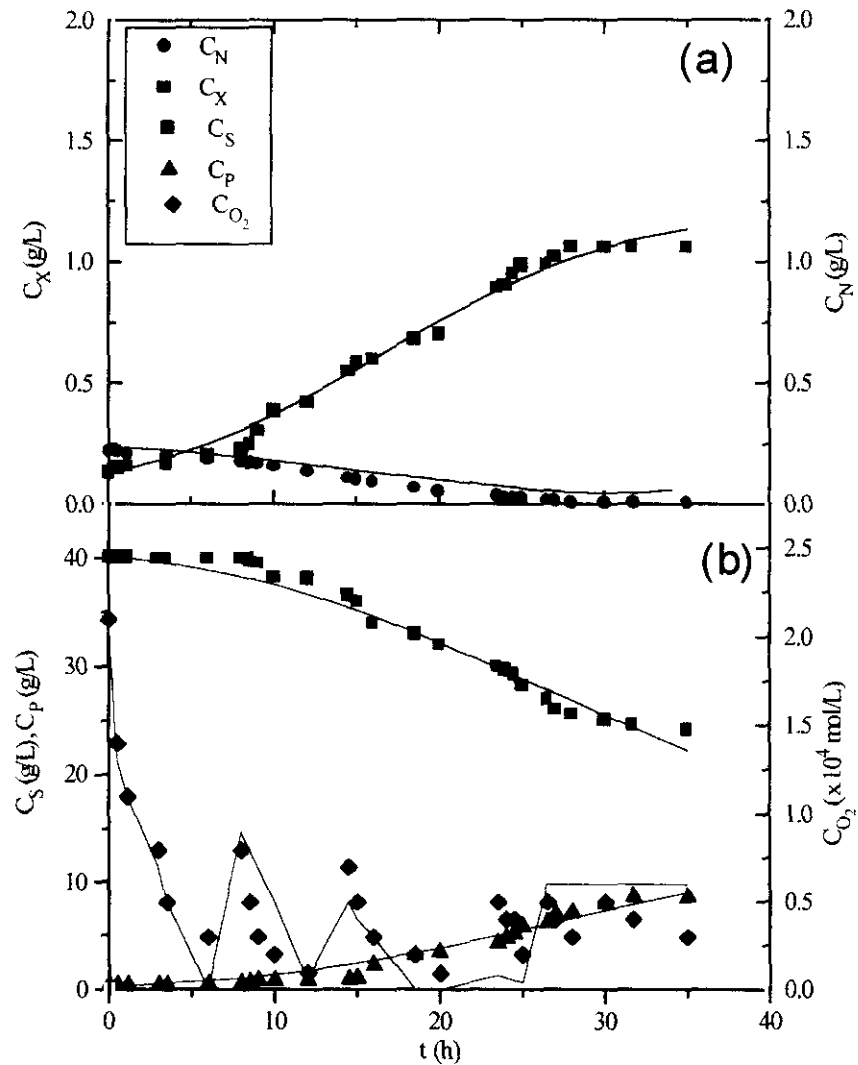


Figura 4.4- Ajuste de los datos experimentales del **experimento n° 3** al MCNE, realizado con *Xanthomonas campestris* a la temperatura de **31° C**, medio A (**257 p.p.m. de amonio**), programación de agitación (210 r.p.m. inicial).

(a) Evolución de biomasa y amonio

(b) Evolución de xantano, azúcar y oxígeno disuelto

Tabla 4.5-a- Parámetros físicos y estadísticos obtenidos por ajuste de los resultados del **experimento n° 4** al MCNE, realizado con *Xanthomonas campestris* a la temperatura de **34° C**, medio A (257 p.p.m. de amonio), programación de agitación (210 r.p.m. inicial).

T (°C)	Parám.	Valor del Parámetro			t Student		F Fischer		SRC
		Máx.	Ópt.	Mín.	Obtenido	Tabulado (95%)	Obtenido	Tabulado (95%)	
34	k_x	0,439	0,423	0,408	57,77	2,110	4263	3,59	$0,8 \cdot 10^{-3}$
	Y_{XN}	5,021	4,732	4,443	34,53				
	m_s	-0,103	-1,151	-1,275	-10,36	2,120	128	3,59	$3,1 \cdot 10^{-3}$
	Y_{XS}	0,085	0,0847	0,0843	496				
	k_p	$9,30 \cdot 10^{-3}$	$8,01 \cdot 10^{-3}$	$6,71 \cdot 10^{-3}$	12,08				
	m_{O_2}	-	-	-	-		-	-	-
	Y_{O_2X}	-	-	-	-				

Tabla 4.5-b- Parámetros físicos y estadísticos obtenidos por ajuste de los resultados del **experimento n° 4** al MCNE, realizado con *Xanthomonas campestris* a la temperatura de **34° C**, medio A (257 p.p.m. de amonio), programación de agitación (210 r.p.m. inicial).

T (°C)	Parám.	Valor del Parámetro			t Student		F Fischer		SRC
		Máx.	Ópt.	Mín.	Obtenido	Tabulado (95%)	Obtenido	Tabulado (95%)	
34	m_s	-	-	-	-	2,120	128	3,59	$3,1 \cdot 10^3$
	Y_{XS}	0,1044	0,0847	0,0843	496				
	k_p	$9,30 \cdot 10^{-3}$	$8,01 \cdot 10^{-3}$	$6,71 \cdot 10^{-3}$	12,08				
	m_{O_2}	$8,85 \cdot 10^{-3}$	$7,10 \cdot 10^{-3}$	$5,34 \cdot 10^{-4}$	8,55	2,110	265,0	3,59	$1,0 \cdot 10^{-3}$
	$Y_{O_2:X}$	56,47	46,38	36,31	9,70				

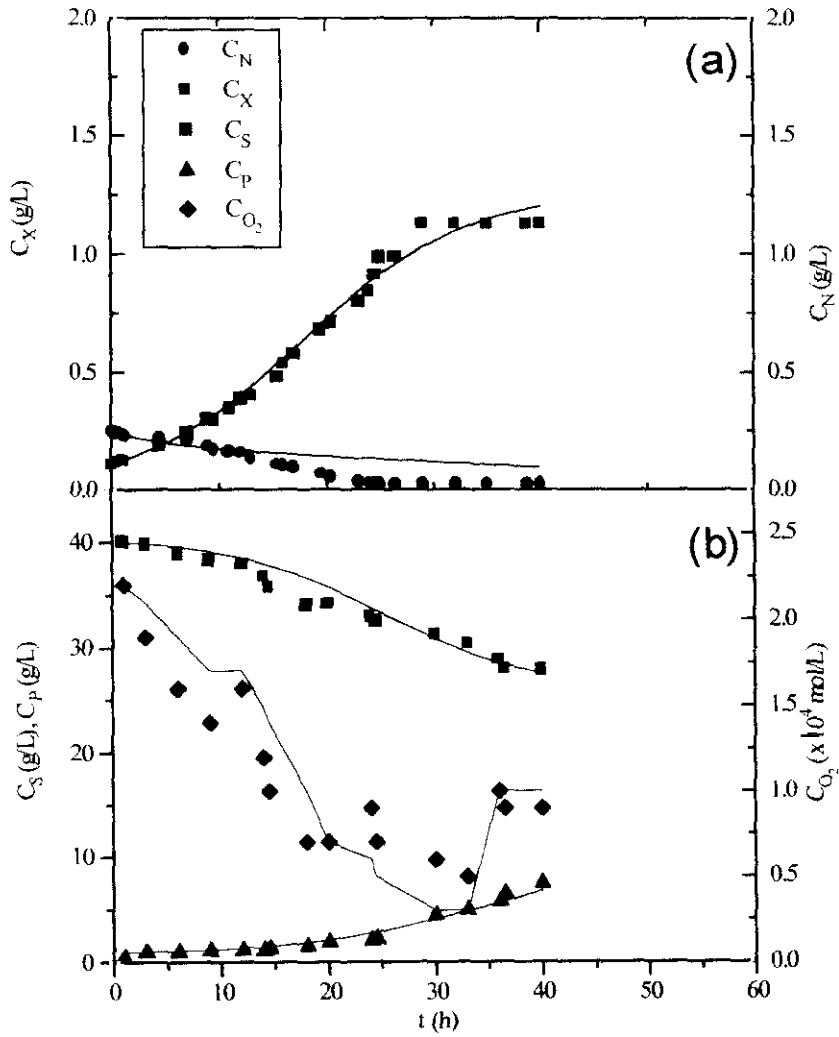


Figura 4.5- Ajuste de los datos experimentales del **experimento n° 4** al MCNE, realizado con *Xanthomonas campestris* a la temperatura de 34° C, medio A (257 p.p.m. de amonio), programación de agitación (210 r.p.m. inicial).
 (a) Evolución de biomasa y amonio
 (b) Evolución de xantano, azúcar y oxígeno disuelto

Tabla 4.5-b- Parámetros físicos y estadísticos obtenidos por ajuste de los resultados del **experimento n° 4** al MCNE, realizado con *Xanthomonas campestris* a la temperatura de **34° C**, medio A (**257 p.p.m.** de amonio), programación de agitación (210 r.p.m. inicial).

T (°C)	Parám.	Valor del Parámetro			t Student		F Fischer		SRC
		Máy.	Ópt.	Mín.	Obtenido	Tabulado (95%)	Obtenido	Tabulado (95%)	
34	m _s	-	-	-	-	2,120	128	3,59	3,1.10 ⁻³
	Y _{XS}	0,1044	0,0847	0,0843	496				
	k _p	9,30.10 ⁻³	8,01.10 ⁻³	6,71.10 ⁻³	12,08				
	mo ₂	8,85.10 ⁻³	7,10.10 ⁻³	5,34.10 ⁻⁴	8,55	2,110	265,0	3,59	1,0.10 ⁻³
	Y _{O₂X}	56,47	46,38	36,31	9,70				

Tabla 4.6- Parámetros físicos y estadísticos obtenidos por ajuste de los resultados del **experimento n° 5** al MCNE, realizado con *Xanthomonas campestris* a la temperatura de **28° C**, medio A (**65 p.p.m.** de amonio), programación de agitación (210 r.p.m. inicial).

NH₄⁺ (p.p.m.)	Parám.	Valor del Parámetro			t Student		F Fischer		SRC
		Máx.	Ópt.	Mín.	Obtenido	Tabulado (95%)	Obtenido	Tabulado (95%)	
65	k _X	3,858	3,547	3,235	24,025	2,110	639,6	3,59	0,63.10 ⁻¹
	Y _{XN}	12,61	11,54	10,49	23,061				
	m _s	24,44	22,65	20,80	24,900	2,120	82,52	3,24	0,32.10 ⁻⁴
	Y _{XS}	4,8.10 ⁻³	4,79.10 ⁻³	4,77.10 ⁻³	888,5				
	k _p	0,619	0,565	0,512	21,610				
	mo ₂	1,28.10 ⁻³	1,00.10 ⁻³	7,34.10 ⁻⁴	7,780	2,110	63,59	3,59	0,32.10 ⁻⁸
	Y _{O₂X}	33,57	27,80	22,04	2,790				

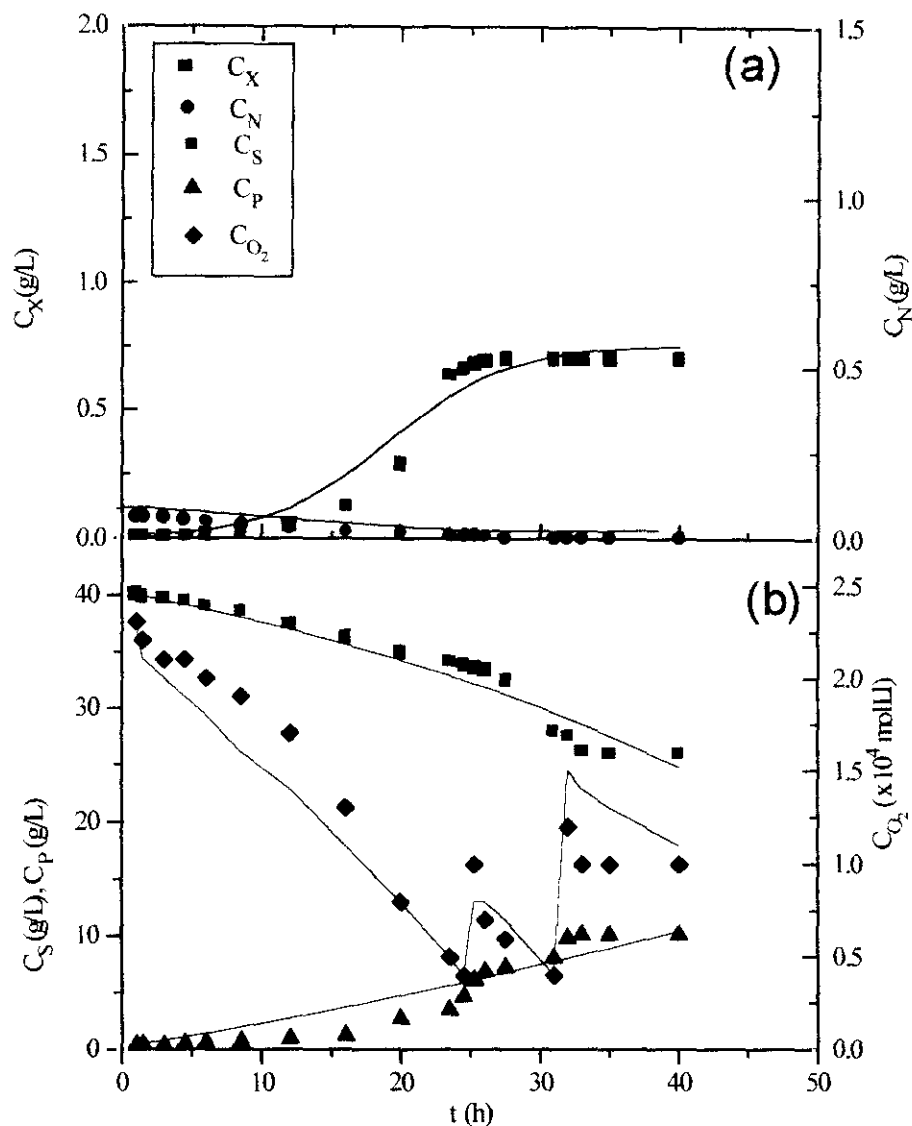


Figura 4.6- Ajuste de los datos experimentales del **experimento n° 5** al MCNE, realizado con *Xanthomonas campestris* a la temperatura de **28° C**, medio A (**65 p.p.m. de amonio**), programación de agitación (210 r.p.m. inicial).

(a) Evolución de biomasa y amonio

(b) Evolución de xantano, azúcar y oxígeno disuelto

Tabla 4.7-- Parámetros físicos y estadísticos obtenidos por ajuste de los resultados del **experimento n° 6** al MCNE, realizado con *Xanthomonas campestris* a la temperatura de **28 ° C**, medio A (**130 p.p.m.** de amonio), programación de agitación (210 r.p.m. inicial).

NH₄⁺ (p.p.m.)	Parám.	Valor del Parámetro			t Student		F Fischer		SRC
		Máx.	Ópt.	Mín.	Obtenid o	Tabulado (95%)	Obtenido	Tabulado (95%)	
130	k _X	1,767	1,718	1,669	24,21	2,080	1262	3,44	3,2.10 ⁻²
	Y _{XN}	5,568	5,433	5,298	37,30				
	m _s	0,325	0,324	0,323	797,4	2,086	121,3	3,05	0,3.10 ⁴
	Y _{XS}	4,193	2,535	0,876	3,084				
	k _P	7,13.10 ⁻³	6,65.10 ⁻³	6,17.10 ⁻³	27,86				
	mo ₂	3,29.10 ⁻³	2,59.10 ⁻³	1,41.10 ⁻³	7,780	2,080	63,59	3,44	0,5.10 ⁻⁷
	Y _{O₂X}	42,93	24,62	6,322	2,790				

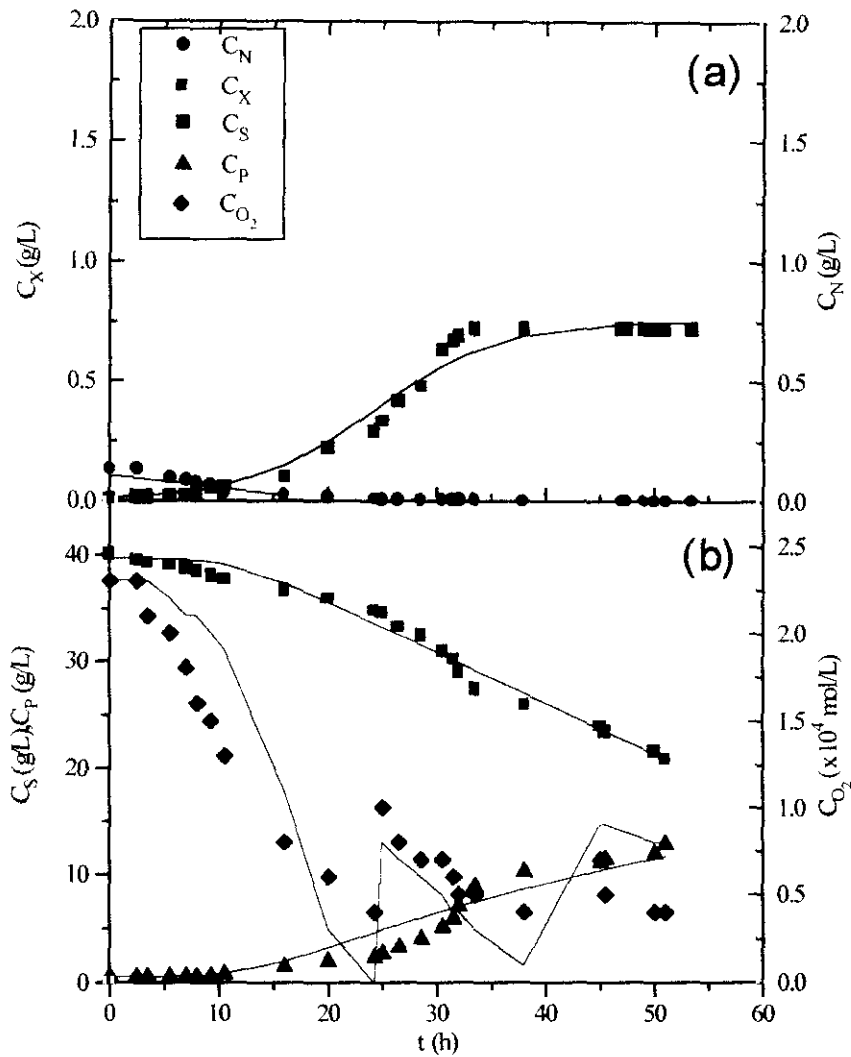


Figura 4.7- Ajuste de los datos experimentales del **experimento n° 6** al MCNE, realizado con *Xanthomonas campestris* a la temperatura de **28° C**, medio A (**130 p.p.m. de amonio**), programación de agitación (210 r.p.m. inicial).

(a) Evolución de biomasa y amonio

(b) Evolución de xantano, azúcar y oxígeno disuelto

Tabla 4.8- Parámetros físicos y estadísticos obtenidos por ajuste de los resultados del **experimento n° 7** al MCNE, realizado con *Xanthomonas campestris* a la temperatura de **28° C**, medio A (**475 p.p.m.** de amonio), programación de agitación (210 r.p.m. inicial).

NH ₄ ⁺ (p.p.m.)	Parám	Valor del Parámetro			t Student		F Fischer		SRC
		Máx.	Ópt.	Mín.	Obtenido	Tabulado (95%)	Obtenido	Tabulado (95%)	
475	k _X	0,381	0,371	0,35	56,88	2,074	1603	3,44	6,4.10 ⁻²
	Y _{XN}	2,12	2,02	1,91	40,38				
	m _s	0,268	0,144	0,02	18,85	2,080	668	3,05	3,1.10 ³
	Y _{XS}	0,0687	0,0685	0,0683	352,5				
	k _p	0,0189	0,0167	0,0146	15,48				
	mo ₂	8,7210 ⁻⁴	3,3.10 ⁻⁴	-1,87.10 ⁻⁴	-2,68	2,074	81,76	3,44	8,4.10 ⁻⁸
	Y _{O₂X}	14,54	9,25	3,95	3,643				

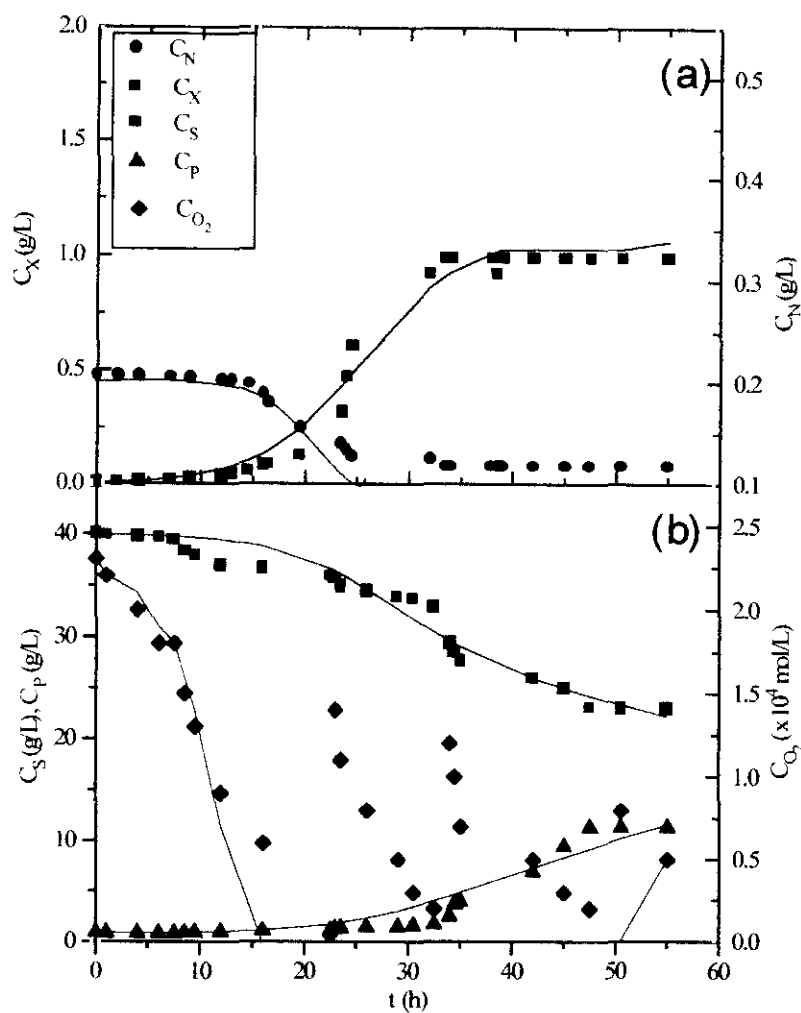


Figura 4.8- Ajuste de los datos experimentales del **experimento 7** al MCNE, realizado con *Xanthomonas campestris* a la temperatura de **28° C**, medio A (**475 p.p.m. de amonio**), programación de agitación (210 r.p.m. inicial).

(a) Evolución de biomasa y amonio

(b) Evolución de xantano, azúcar y oxígeno disuelto

4.3.- DISCUSIÓN

4.3.1- Variación del Valor de los Parámetros con las Variables

4.3.1.1.- Influencia de la Temperatura

En el primer capítulo de este trabajo, ya fue comentada la importancia de la temperatura en la producción de xantano. En trabajos previos (Santos, 1993; García-Ochoa y col., 1995), se observó la influencia de esta variable sobre la producción del polisacárido, obteniéndose un máximo de producción a 28°C. Como en todo proceso químico, la temperatura debe influir mucho, exponencialmente, en la velocidad de las reacciones químicas. Sin embargo, al evaluar un proceso complejo, como el crecimiento de un microorganismo y la producción, en este caso, de un polisacárido, dicha influencia puede quedar enmascarada. No obstante, es de esperar que la temperatura influya en el valor de los parámetros cinéticos y de equilibrio que aparecen en las ecuaciones cinéticas. Esto se analiza a continuación.

En las Figuras 4.9 y 4.10 se muestran las evoluciones de los parámetros obtenidos del ajuste al MCNE para los experimentos realizados a diferentes temperaturas.

En la Figura 4.9 (a y b) se muestran las evoluciones de los parámetros relacionados con el crecimiento, obtenidos del ajuste de los datos experimentales a la ecuación logística. Se observa que el parámetro k_X , indicativo de la velocidad de crecimiento (Figura 4.9-a), muestra una tendencia descendente con la temperatura. El parámetro Y_{XN} (Figura 4.9-b) en cambio no parece mostrar una evolución clara con la temperatura. Por ello, no es posible realizar un ajuste de estos parámetros a funciones matemáticas que los relacionen con temperatura.

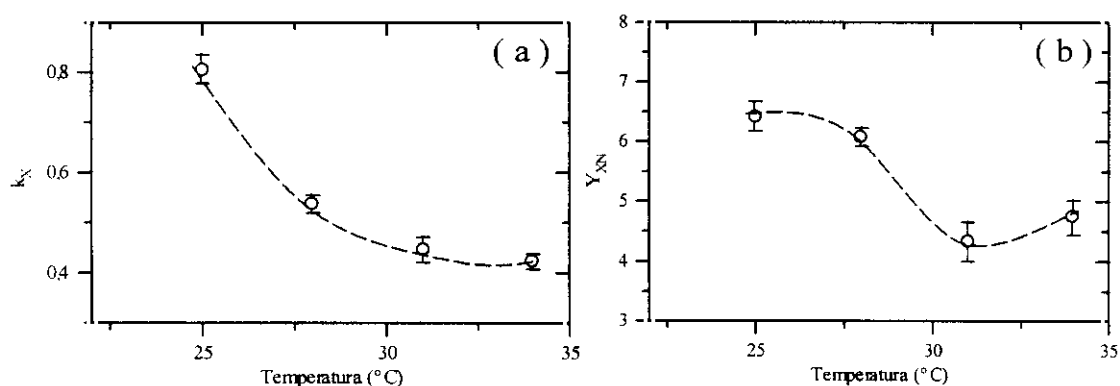


Figura 4.9.- Evolución de los parámetros con la temperatura obtenidos por ajuste con la ecuación logística.

En la Figura 4.10 (a, b, c) se muestran las evoluciones de los parámetros relacionados con las velocidades de producción del xantano y consumo de azúcar en función de la temperatura. La tendencia de m_s y Y_{xs} presenta un valor máximo a 31° C, mientras que el parámetro k_p parece mostrar la misma tendencia pero con un máximo en 28 ° C.

En la Figura 4.10 (d y e) se muestran las tendencias de los parámetros relacionados con el oxígeno - m_{O_2} e Y_{O_2X} - respecto a la temperatura. Puede observarse que ambos parámetros tienen una tendencia más o menos lineal con dicha variable; m_{O_2} muestra una evolución ascendente, mientras que Y_{O_2X} presenta una evolución descendente.

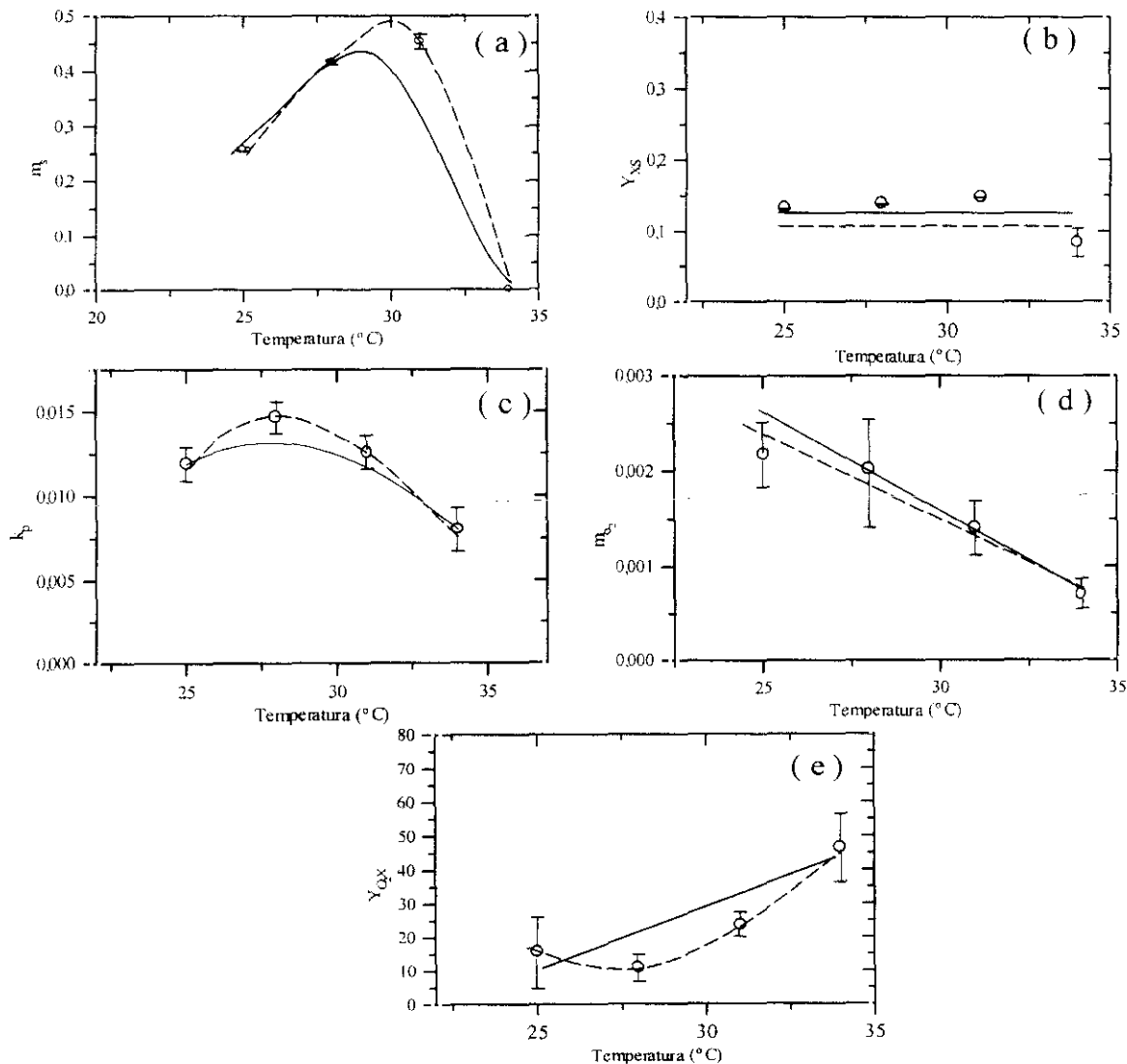


Figura 4.10.- Evolución de los parámetros del MCNE con la temperatura. La línea discontinua indica la tendencia teórica de los parámetros y la continua el ajuste del modelo en función de la temperatura (MCNE(T)).

(a) m_s (b) Y_{xs} (c) k_p (d) m_{O_2} (e) Y_{O_2X}

De acuerdo con estas observaciones, se pensó que los parámetros correspondientes a m_s y k_p , podían ser ajustados en función de la temperatura de acuerdo con la expresión de Ratkowsky y col. (1983), según la ecuación [4.21]:

$$k(T) = \{ C_1 \cdot (T - T_{min}) \cdot [1 - \exp(C_2 \cdot (T - T_{max}))] \}^2 \quad [4.21]$$

El parámetro Y_{xs} , en cambio, se supuso constante durante el ajuste en el que se dejó flotar el resto de los parámetros, debido a que el valor del parámetro obtenido para todas las temperaturas es similar.

En la Figura 4.10 (d y e) se muestran las tendencias de los parámetros relacionados con el oxígeno - m_{O_2} y Y_{O_2X} - respecto a la temperatura. Puede observarse que ambos parámetros tienen una tendencia más o menos lineal con dicha variable. - m_{O_2} presenta una evolución ascendente, mientras, Y_{O_2X} presenta tendencia descendente.

El ajuste conjunto de todos los datos de los experimentos realizados a diferentes temperaturas (experimentos del 1 al 4) al MCNE (T) (Modelo Cinético No Estructurado en función de T) para m_s , Y_{xs} y k_p fue realizado en múltiple-respuesta, considerando como respuestas: sacarosa y xantano. Debido a las tendencias presentadas por estos parámetros en función de la temperatura, -mostradas anteriormente en la Figura 4.10 (a, b, c), respectivamente- se realizó el ajuste de acuerdo a las funciones representadas en las ecuaciones [4.22] a [4.24]. Este MCNE(T) tiene nueve parámetros: C_1 , T_{min} , C_2 , T_{max} , C'_1 , T'_{min} , C'_2 , T'_{max} y C_3 :

$$m_s(T) = \{ C_1 \cdot (T - T_{min}) \cdot [1 - \exp(C_2 \cdot (T - T_{max}))] \}^2 \quad [4.22]$$

$$k_p(T) = \{ C'_1 \cdot (T - T'_{min}) \cdot [1 - \exp(C'_2 \cdot (T - T'_{max}))] \}^2 \quad [4.23]$$

$$Y_{xs}(T) = C_3 \quad [4.24]$$

La Tabla 4.9 muestra los parámetros obtenidos del ajuste de los cuatro experimentos realizados a distintas temperaturas a este modelo en función de dicha temperatura. Como puede observarse, los parámetros correspondientes al parámetro m_s dan un resultado estadístico aceptable al igual que sucede con el parámetro Y_{xs} , donde se observa el valor elevado de la t de Student. En cuanto a los parámetros C'_1 y C'_2 , correspondientes al ajuste del

parámetro k_p a una función de tipo Ratkowsky, se observa que ambos incluyen el cero y ninguno supera el valor de t de Student tabulado.

En cuanto a la evolución de la concentración de oxígeno disuelto, el modelo en función de la temperatura ha sido realizado en simple respuesta. En este caso, el ajuste de los datos experimentales se ha hecho teniendo en cuenta la evolución lineal de los parámetros relacionados con este componente, esto es, m_{O_2} e $Y_{O_2,X}$. En este caso, se tienen cuatro parámetros en el modelo en función de la temperatura: α , β , α' , β' , tal como se muestra en las ecuaciones [4.25] y [4.26]:

$$m_{O_2}(T) = \alpha + \beta \cdot T \quad [4.25]$$

$$Y_{O_2,X} = \alpha' + \beta' \cdot T \quad [4.26]$$

Los valores de estos cuatro parámetros, así como sus valores estadísticos de se muestran también en la Tabla 4.9. Como puede observarse, los parámetros α' y β' correspondientes al parámetro $Y_{O_2,X}$ incluyen el cero, y ninguno cumple las restricciones estadísticas impuestas, es decir, que los valores de t de Student obtenidos no superan los valores tabulados teóricos.

Los ajustes de los parámetros en función de la temperatura a las funciones matemáticas que se han mostrado se presentan en la Figura 4.10, donde aparecen como línea continua. Este ajuste es el resultado de sustituir las temperaturas en las siguientes ecuaciones con los valores correspondientes de los parámetros obtenidos (con un 95% de probabilidad):

$$m_S = \{0,227 \cdot (T - 16,6) \cdot [1 - \exp(0,068 \cdot (T - 35,54))]\}^2 \quad [4.27]$$

$$k_p = \{0,00152 \cdot (T - 17,36) \cdot [1 - \exp(0,651 \cdot (T - 39,23))]\}^2 \quad [4.28]$$

$$Y_{xs}(T) = 0,1445 \quad [4.29]$$

$$m_{O_2}(T) = 9,8 \cdot 10^{-3} + (-2,6 \cdot 10^{-4}) \cdot T \quad [4.30]$$

$$Y_{O_2,X}(T) = -5,6 + 0,89 \cdot T \quad [4.31]$$

Todos los datos experimentales obtenidos en los experimentos realizados a diferentes temperaturas han sido reproducidos mediante la sustitución de las ecuaciones [4.27] a [4.31] en el MCNE. Las Figuras 4.11 a 4.12 muestran la reproducción de los resultados experimentales con dicho MCNE (T).

Como es lógico, y ya que no se ha conseguido una buena estadística de los valores de los parámetros en función de la temperatura, este modelo MCNE(T) no mejora la reproducción de los datos experimentales obtenidos experimento a experimento. De hecho, en alguno de los experimentos, como a 28° C y 25° C, la reproducción de los datos experimentales es mucho peor que la obtenida con el MCNE, especialmente en la descripción de la evolución del oxígeno. Por ello, no es posible aceptar este modelo MCNE(T) como válido, y podemos concluir que el modelo cinético no estructurado no es capaz de predecir la evolución de los parámetros en función de la variable temperatura.

TABLA 4.9- Valores físicos y estadísticos de los parámetros obtenidos mediante el ajuste de los datos experimentales de los experimentos al MCNE (T).

Parámetros				t Student		F Fischer		SRC
Parámetro	Máximo	Óptimo	Mínimo	Obtenido	Tabulado	Obtenido	Tabulado	
C ₁	0,229	0,227	0,225	232,8	1,98	13181,9	1,97	0,17.10 ³
T _{min}	16,85	16,60	16,35	133				
C ₂	0,6805	0,6802	0,6800	4800				
T _{max}	35,76	35,54	35,32	32,62				
C' ₁	0,139	0,00152	-0,136	0,0221				
T' _{min}	22,04	17,36	12,68	7,426				
C' ₂	58,4	0,651	-57,1	0,0225				
T' _{max}	41,78	39,23	36,68	30,75				
C ₃	0,1447	0,1445	0,1442	1107	2,09	153,44	2,46	0,12.10 ⁻⁶
α	0,0134	0,00988	0,00628	5,492				
β	-1,115.10 ⁻⁴	-2,69.10 ⁻⁴	-3,8.10 ⁻⁴	4,75				
α'	25,40	-5,67	-36,74	-0,364				
β'	1,941	0,893	-1,555	1,941				

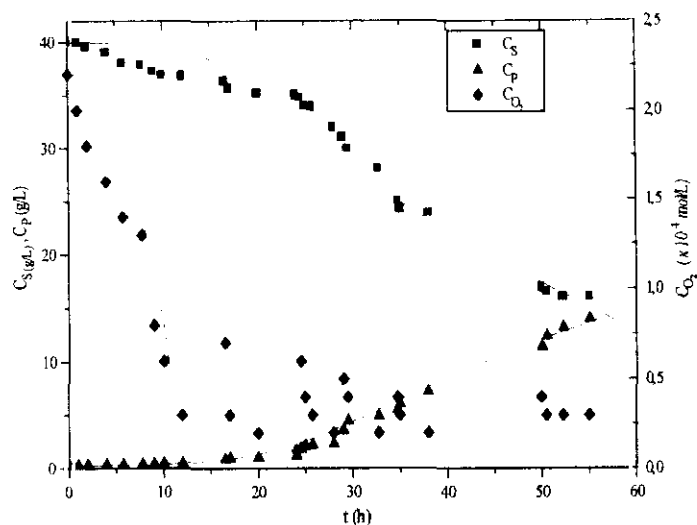


Figura 4.11.- Ajuste de los datos experimentales del **experimento n° 1** al MCNE(T) realizado con *Xanthomonas campestris* a la temperatura de **25° C**, medio A (**257 p.p.m.** de amonio), programación de agitación (210 r.p.m. inicial).

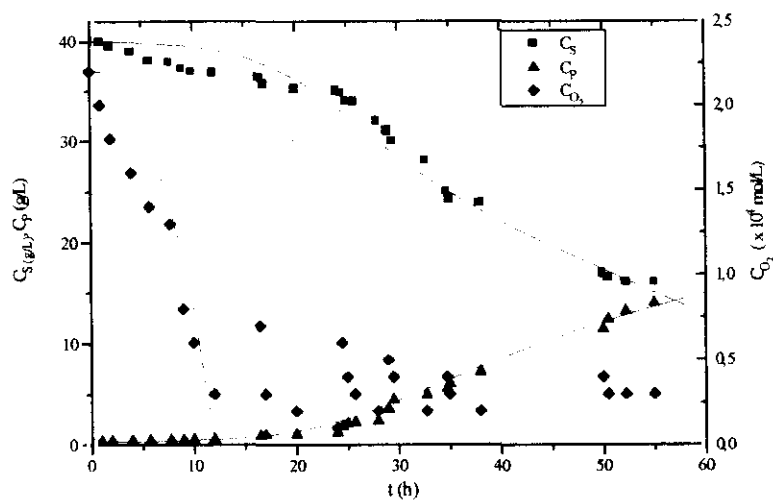


Figura 4.12.- Ajuste de los datos experimentales del **experimento n° 2** al MCNE(T) realizado con *Xanthomonas campestris* a la temperatura de **28° C**, medio A (**257 p.p.m.** de amonio), programación de agitación (210 r.p.m. inicial).

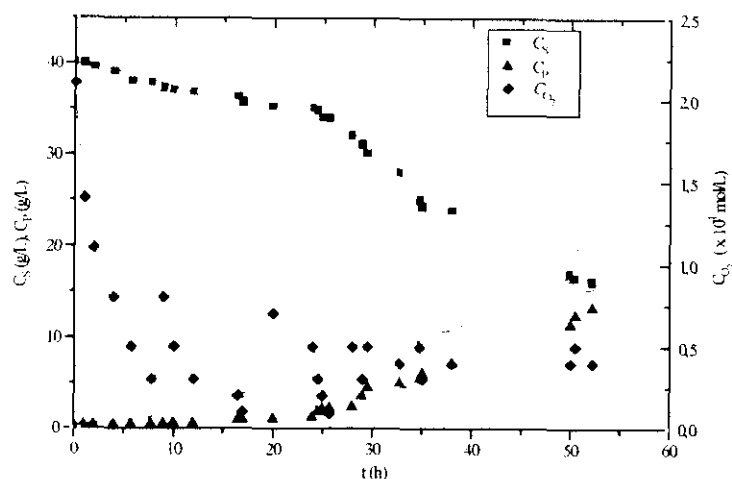


Figura 4.13.- Ajuste de los datos experimentales del **experimento n° 3** al MCNE(T) realizado con *Xanthomonas campestris* a la temperatura de 31° C, medio A (257 p.p.m. de amonio), programación de agitación (210 r.p.m. inicial).

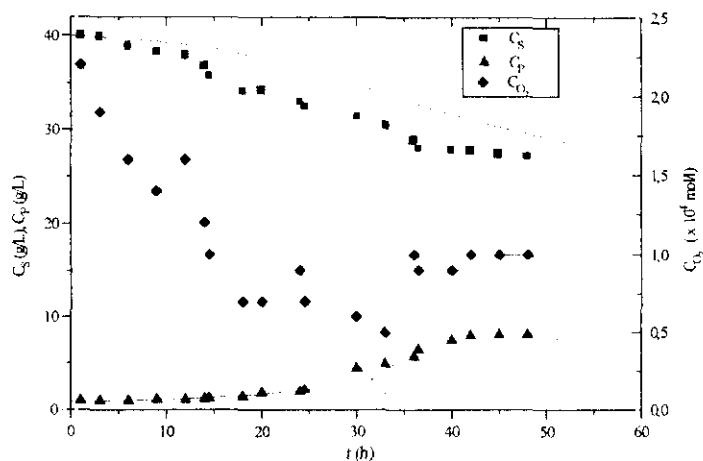


Figura 4.14.- Ajuste de los datos experimentales del **experimento n° 4** al MCNE(T) realizado con *Xanthomonas campestris* a la temperatura de 34° C, medio A (257 p.p.m. de amonio), programación de agitación (210 r.p.m. inicial).

4.3.1.2- Influencia de la Concentración de Amonio Inicial

La concentración de amonio es una variable importante en el proceso de producción, pues es el nutriente limitante en el crecimiento en el medio de producción empleado. Es un componente que influye significativamente en la concentración de biomasa obtenida durante el proceso. Por esta razón se ha realizado el estudio de la influencia de esta variable en los parámetros del modelo.

La evolución de los parámetros obtenidos de la aplicación del MCNE a los experimentos realizados con diferentes concentraciones de amonio se muestra en las Figuras 4.15 y 4.16.

En la Figura 4.15 se muestran las tendencias de los parámetros relacionados con el crecimiento, donde se observa que, al igual que ocurría con la temperatura, no es posible relacionar los parámetros de crecimiento obtenidos con funciones que los relacionen con la concentración de amonio. Se observa que el parámetro k_X -indicativo de la velocidad de crecimiento- muestra una tendencia descendente con la concentración de amonio. El parámetro relativo al rendimiento de amonio en biomasa (Y_{XN}) presenta un valor máximo en 65 p.p.m. y un valor mínimo en 514 p.p.m., mientras que con 130 p.p.m. y 257 p.p.m. no presenta diferencias significativas.

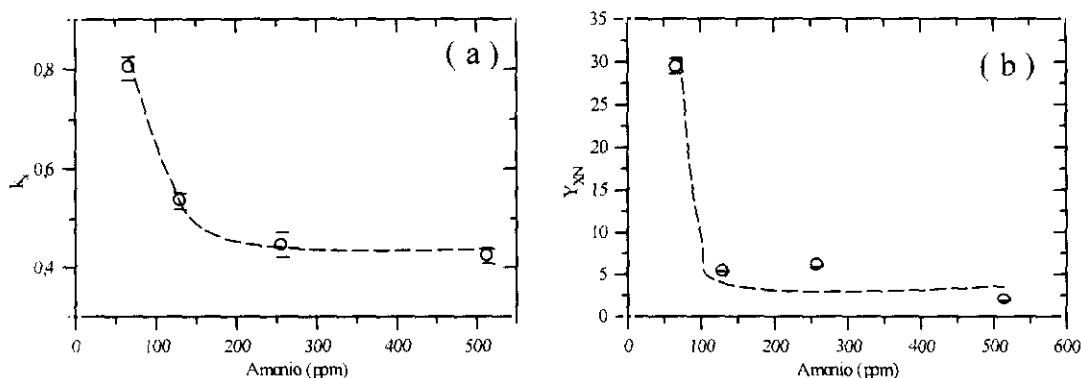


Figura 4.15.- Evolución de los parámetros del crecimiento en función de la concentración de Amonio.

a) k_X b) Y_{XN}

En la Figura 4.16 (a, b, c) se muestran las tendencias en función de la concentración inicial de amonio, de los parámetros del MCNE relacionados con las velocidades de producción del azúcar y del xantano: m_s , Y_{XS} y k_p . La evolución de los parámetros relacionados con la evolución del oxígeno, m_{O_2} e Y_{O_2X} , aparecen en la Figura 4.16d y 4.16e, respectivamente.

Ninguno de los parámetros del MCNE muestra una tendencia clara ni lógica en función de la concentración de amonio. Por ello, en este caso no es posible siquiera plantear ecuaciones matemáticas para proponer un modelo cinético en función de la variable estudiada, tal como se intentó en el caso de la temperatura. Además, con este modelo no fue posible obtener una buena reproducción de la evolución del amonio, tal como fue mostrado en las Figuras 4.2a a 4.8a. Por tanto, es lógico pensar que el modelo es incapaz de mostrar una evolución de parámetros en función de esta variable.

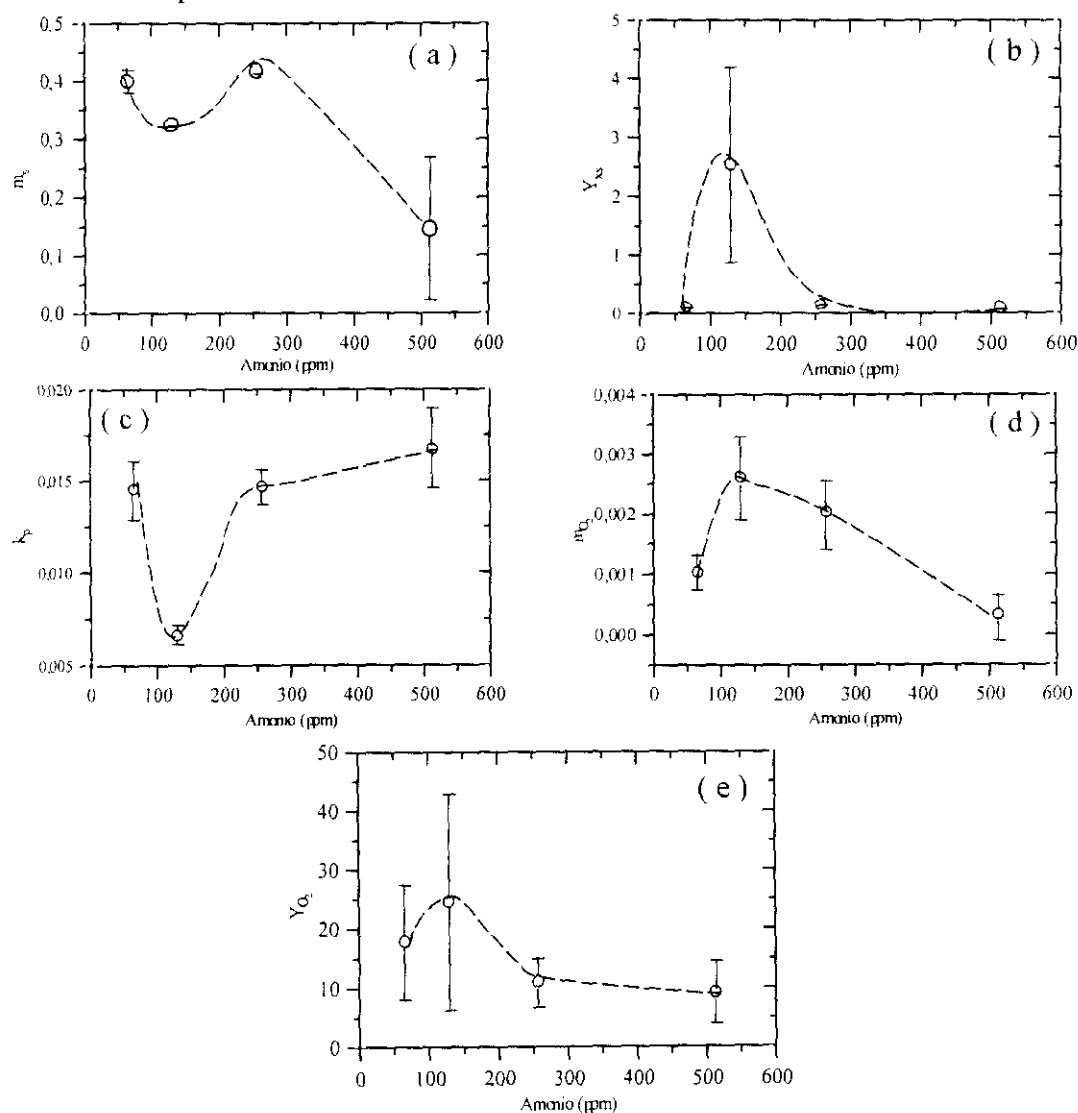


Figura 4.16- Evolución de parámetros del MCNE con la concentración amonio.

4.3.2.- Simulación de una Operación Discontinua con el Modelo Cinético No Estructurado

La realización de simulaciones con modelos cinéticos constituye una herramienta predictiva muy útil, permitiendo prever lo que ocurre cuando se modifican ciertas condiciones durante el proceso, sin necesidad de experimentar, lo cual permite un gran ahorro de trabajo y tiempo. La simulación debe de ser realizada con un modelo correcto, es decir aquel cuyo planteamiento y parámetros permitan predecir de la forma más fiable lo que puede ocurrir ante cambios en las condiciones de operación. De esta manera, una vez obtenidos los parámetros de un modelo bajo ciertas condiciones de operación es posible realizar simulaciones considerando otras condiciones iniciales (temperatura, velocidad de agitación, cambios en la composición del medio, etc); otros tipos de reactores (air-lifts, columnas, etc) o cambio en las dimensiones del reactor empleado. Todo ello implica la utilidad de realizar una simulación para efectuar un cambio de escala en el proceso.

Por todo ello, es importante conocer qué es capaz de predecir el modelo planteado de forma adecuada, hay que saber, también, qué variables influyen en el proceso, y cuánto, es decir, evaluar la sensibilidad del sistema frente a diferentes condiciones de operación.

La forma más adecuada de efectuar las simulaciones con un modelo cinético es empleando parámetros en función de las variables de operación que pudieran influir.

En este capítulo se ha visto que el MCNE no ha podido ser obtenido en función de ninguna de las variables estudiadas –nitrógeno y temperatura-, por lo que realizar simulaciones probando diferentes valores de estas variables no va a permitir obtener buenas predicciones, pues el modelo no contempla esta influencia.

Se han realizado simulaciones que en principio, cabría esperar mostrasen influencia en la evolución de componentes, como concentración de biomasa inicial, concentración de azúcar inicial y concentración de oxígeno disuelto.

Es lógico pensar que la **concentración de biomasa inicial** influya en la evolución de componentes del sistema. Esta concentración de biomasa inicial influye en primera instancia

en la evolución de biomasa tal como contempla la ecuación [4.13] correspondiente a la ecuación logística para el crecimiento. Además, al influir en la concentración de biomasa se verán afectados el resto de componentes del sistema, es decir, concentración de sacarosa (ecuación [4.15]), evolución de oxígeno disuelto (ecuación [4.16]) y evolución de la concentración de xantano (ecuación [4.18]), pues todas incluyen el término de biomasa en sus expresiones.

En cuanto a la **influencia de oxígeno disuelto**, sólo cabe pensar que al modificar alguna condición en el biorreactor que altere su concentración (velocidad de agitación) sólo se ve afectada la propia evolución de este componente, pues a la vista de las ecuaciones del modelo no estructurado, sólo se reflejará la influencia en el coeficiente de transferencia de materia (ecuación [4.17]), y ésta en la ecuación [4.18], correspondiente a la evolución de oxígeno disuelto.

Finalmente, la influencia de la **concentración inicial de sacarosa** se verá reflejada tanto en la evolución de la concentración de producto (ecuación [4.18]), como en la propia evolución del azúcar, tal como indica la expresión dada por la ecuación [4.15].

Así pues, se han realizado diversas simulaciones para observar la influencia de los factores comentados sobre la producción, el crecimiento o la evolución de oxígeno disuelto durante la fermentación.

En la Tabla 4.8 se muestran las condiciones de operación empleadas en diferentes simulaciones que han sido realizadas con el MCNE en operación en discontinuo. Las simulaciones se han realizado cambiando el valor inicial de diversos factores cuya influencia en el proceso es de sobra conocida (Santos, 1993).

Tabla 4.8 .- Simulaciones realizadas con el MCNE en operación discontinua.

Simulación	Valores
Influencia de la concentración de biomasa inicial	$C_{X0} = 0,03 \text{ g/L}$ $C_{X0} = 0,07 \text{ g/L}$ $C_{X0} = 0,50 \text{ g/L}$ $C_{X0} = 1,00 \text{ g/L}$
Influencia de la concentración azúcar inicial	$C_{S0} = 10 \text{ g/L}$ $C_{S0} = 20 \text{ g/L}$ $C_{S0} = 40 \text{ g/L}$ $C_{S0} = 50 \text{ g/L}$
Influencia de la concentración de oxígeno disuelto	Agitación constante Perfil de agitación

4.3.2.1.- Influencia de la Concentración de Biomasa Inicial

Tal como muestra la Tabla 4.8, se probaron cuatro concentraciones iniciales de biomasa y se observó su influencia en la evolución de los diferentes componentes del modelo: sacarosa, xantano, oxígeno disuelto y biomasa.

La influencia de la biomasa inicial en el **crecimiento**, a lo largo del tiempo de fermentación, se muestra en la Figura 4.17. Como puede observarse, cuanto mayor es la concentración inicial, mayor es la concentración máxima de biomasa al final del periodo exponencial de crecimiento.

En cuanto a la influencia sobre la velocidad de **producción de xantano y de consumo de azúcar** (Figura 4.18), se puede apreciar que cuanto mayor es la concentración de biomasa más rápida es la producción, no habiendo diferencias en la concentración final

alcanzada, puesto que ésta se estabiliza cuando se acaba el azúcar. El consumo de sacarosa, como es lógico, es más rápido cuanto más rápida es la producción.

En la Figura 4.19 se observa la mala simulación obtenida para la **evolución de oxígeno disuelto** pues, como ya ha sido comprobado a lo largo de este capítulo este modelo no permite predecir de forma adecuada la evolución de esta variable. En cuanto al valor de la constante de transferencia de oxígeno (k_{LaV}) su valor es mayor cuanto menor es la biomasa inicial, debido, lógicamente, a la relación de éste con la viscosidad del caldo (relacionada a su vez con la concentración de xantano). Si se observa la Figura 4.18 de nuevo, observamos que coincide, en tiempo, que las mayores concentraciones de xantano corresponden, en la Figura 4.19, a los menores valores de k_{LaV} , para finalmente estabilizarse, al igual que la producción del polisacárido.

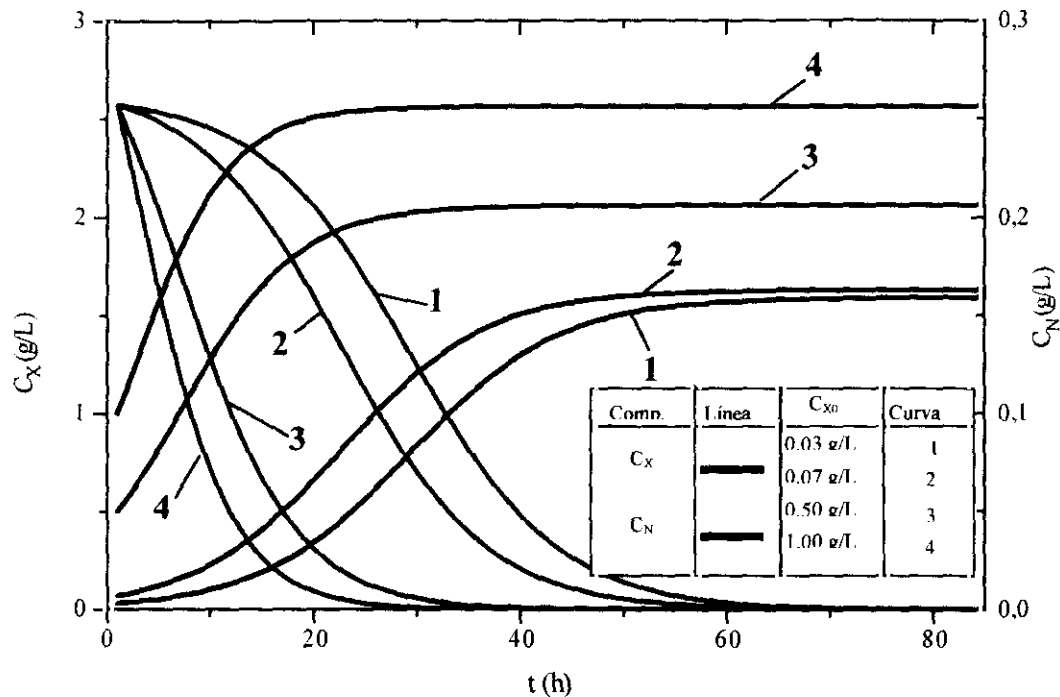


Figura 4.17.- Simulación realizada para la producción de xantano en operación en discontinuo con el Modelo Cinético no estructurado: influencia de la concentración inicial de biomasa sobre la evolución de biomasa.

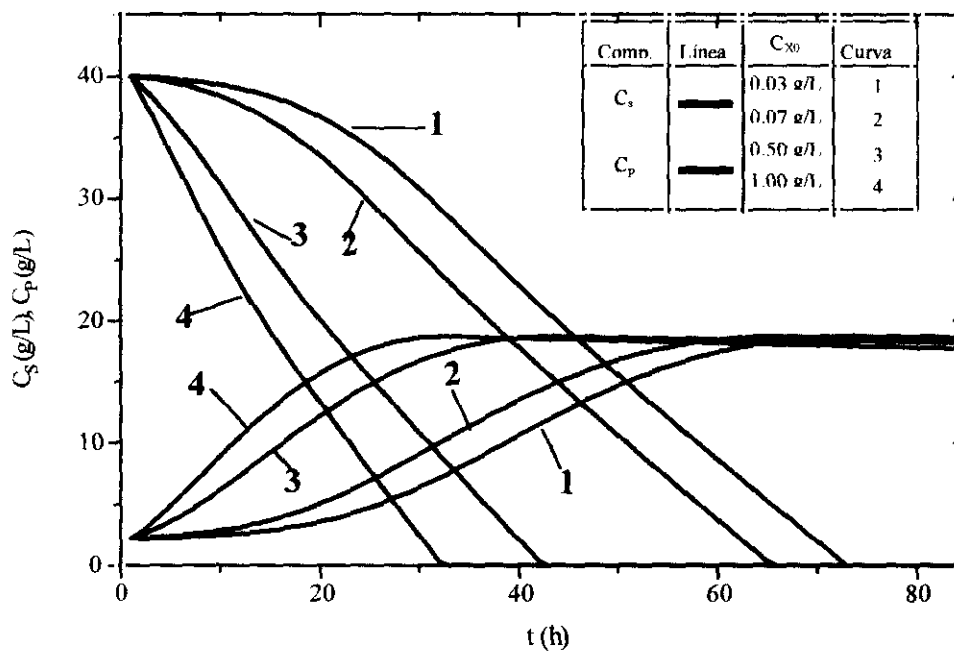


Figura 4.18.- Simulación realizada para la producción de xantano en operación en discontinuo con el Modelo Cinético no estructurado: influencia de la concentración inicial de biomasa sobre la evolución de xantano y sacarosa.

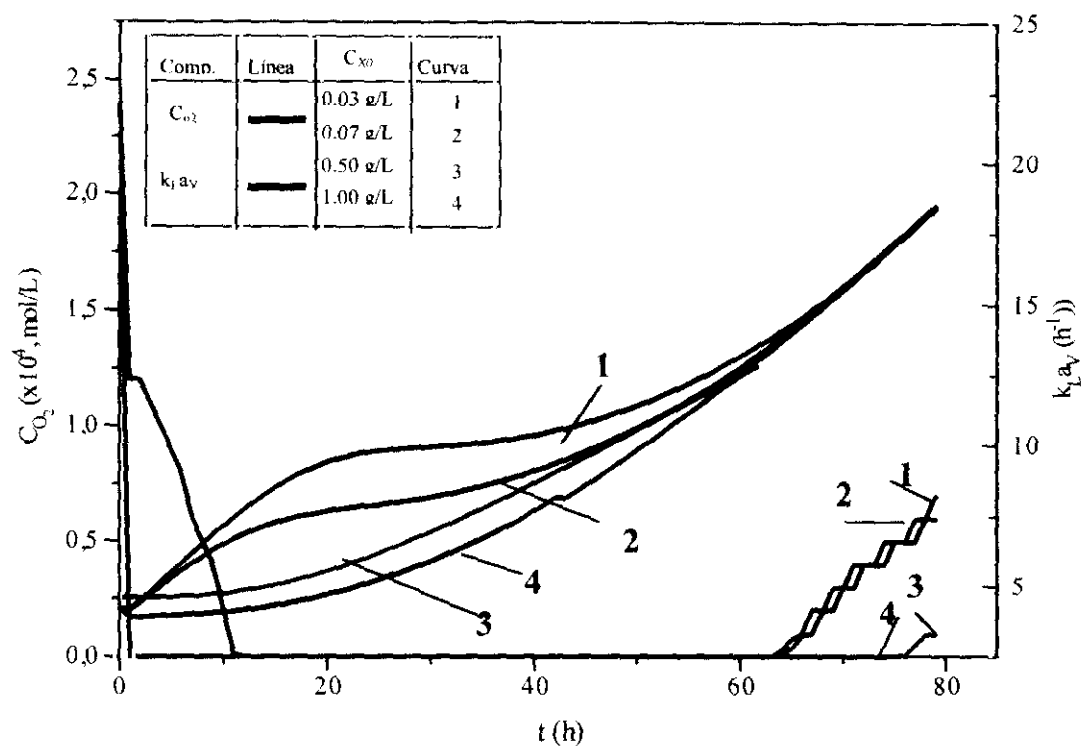


Figura 4.19.- Simulación realizada para la producción de xantano en operación en discontinuo con el Modelo Cinético No Estructurado: influencia de la concentración inicial de biomasa sobre la evolución del oxígeno disuelto y el $k_L a_V$.

4.3.2.2.- Influencia de la Concentración de Inicial Azúcar

Se han realizado simulaciones con cuatro concentraciones iniciales de sacarosa, tal como se ha mostrado en la Tabla 4.8. En cuanto a la influencia en la velocidad del crecimiento, la Figura 4.20 muestra claramente que el modelo predice que la concentración inicial de sacarosa no influye en el crecimiento.

En la Figura 4.21 puede verse como influyen las diferentes concentraciones de azúcar sobre la evolución de la biomasa durante el proceso. El modelo predice que cuanto mayor es la concentración de sacarosa mayor es la concentración de xantano, siendo capaz de predecir que la producción cese cuando la concentración de azúcar es cero, debido a que la ecuación correspondiente a la velocidad de producción de xantano aparece la concentración de azúcar.

La simulación para observar la evolución de oxígeno disuelto puede observarse en la Figura 4.22, donde además de observar la mala predicción de este componente con el modelo cinético no estructurado, se observa la predicción de la evolución del valor de $k_L a_V$ mayor cuanto menor es la concentración inicial de sacarosa.

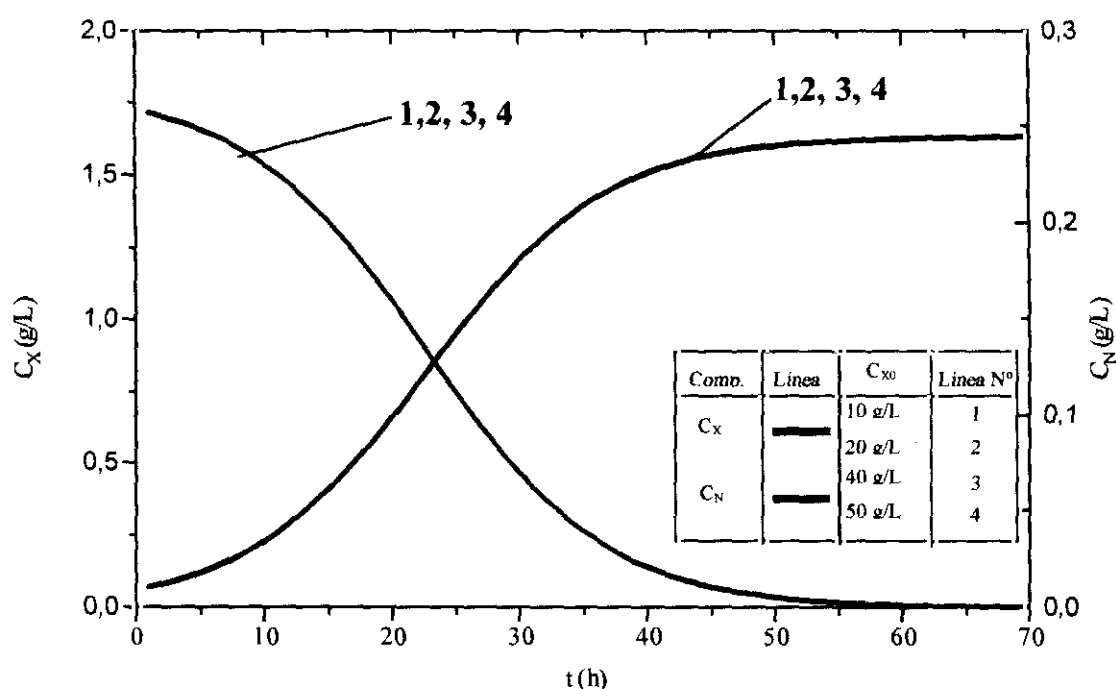


Figura 4.20.- Simulación realizada para la producción de xantano en operación en discontinuo con el Modelo Cinético no estructurado: influencia de la concentración inicial de sacarosa sobre la evolución de biomasa.

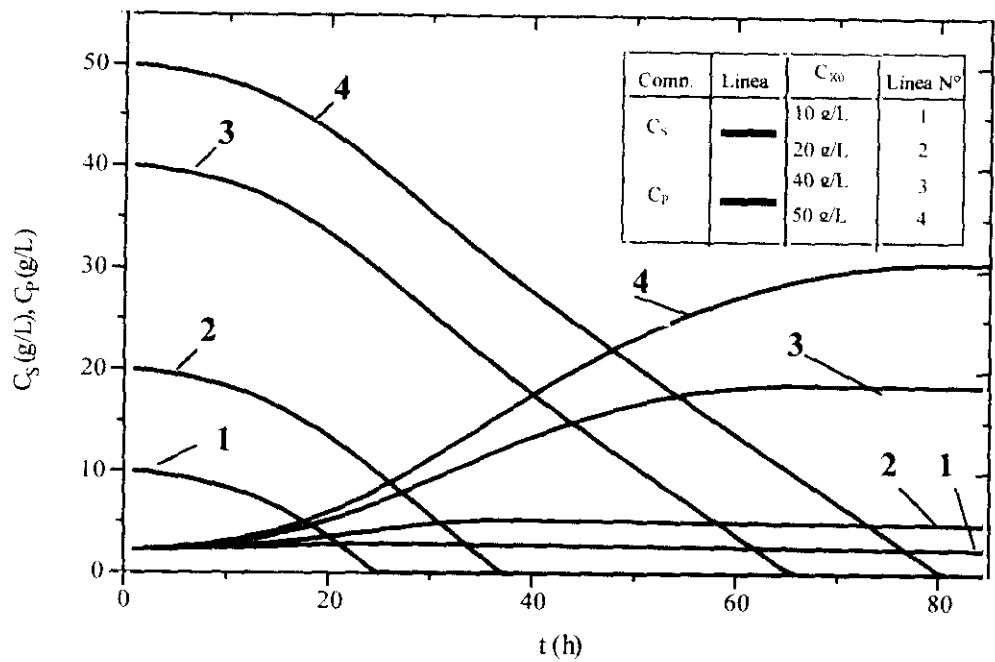


Figura 4.21.- Simulación realizada para la producción de xantano en operación en discontinuo con el Modelo Cinético no estructurado: influencia de la concentración inicial de sacarosa sobre la evolución de xantano y sacarosa.

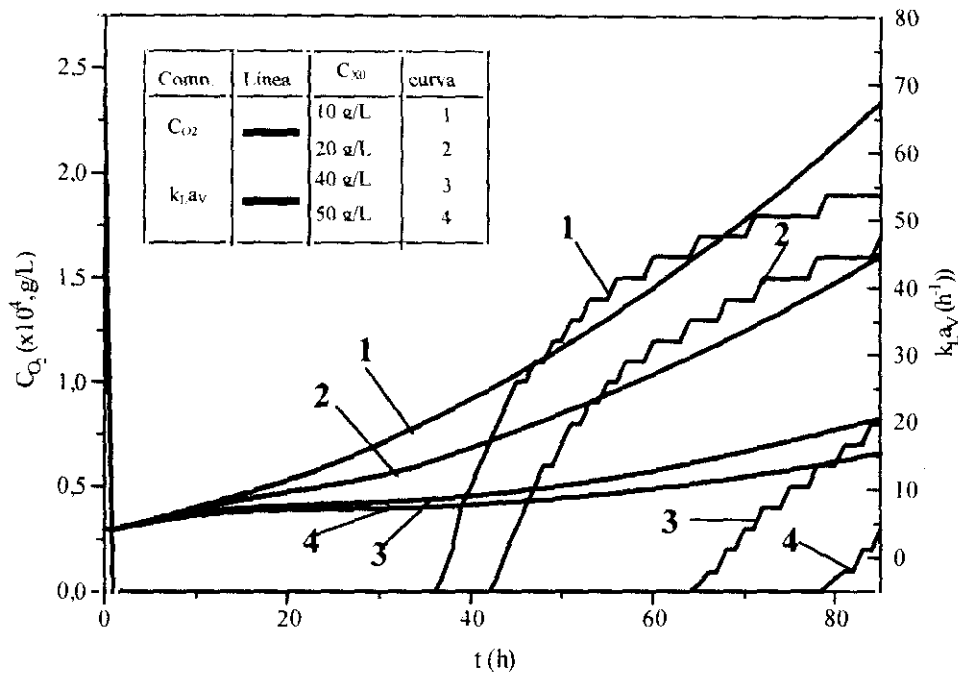


Figura 4.22.- Simulación realizada para la producción de xantano en operación en discontinuo con el Modelo Cinético no estructurado: influencia de la concentración inicial de azúcar sobre la evolución de oxígeno disuelto y k_{LaV} .

4.3.2.3.- Influencia de la Agitación

En las Figuras 4.23 y 4.24 se muestran los resultados obtenidos al realizar simulaciones con el MNE con diferentes programaciones de la velocidad de agitación. Se han realizado simulaciones con una agitación constante y un perfil de agitación. En la Figura 4.23 aparece la influencia de los dos tipos de agitación sobre el crecimiento, el consumo de fuente nitrogenada, sobre la fuente de azúcar y la producción del polisacárido, observándose que el modelo es incapaz de predecir la influencia de la velocidad de agitación en la evolución de estos componentes. Donde si se ve reflejada la influencia de la velocidad de agitación es en la evolución del oxígeno y el valor de la transferencia de oxígeno. (k_{LaV}) tal como se muestra en la Figura 4.24.

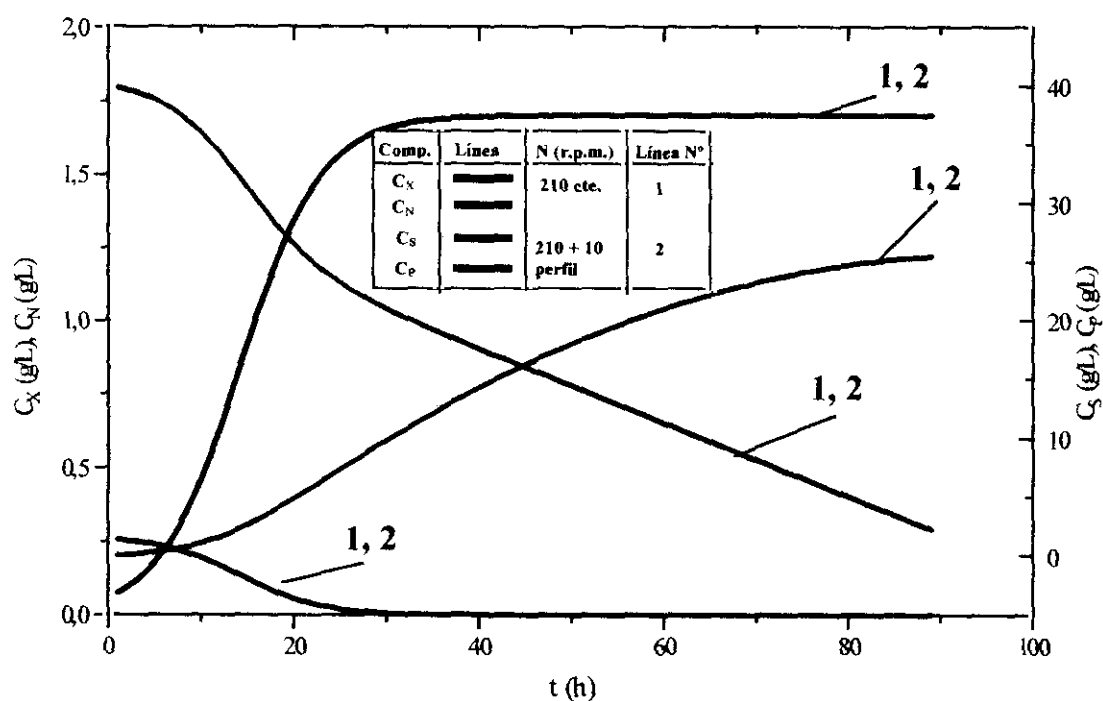


Figura 4.23.- Simulación realizada para la producción de xantano en operación en discontinuo con el Modelo Cinético No Estructurado: influencia de la velocidad de agitación sobre la evolución de amonio, biomasa, sacarosa y xantano.

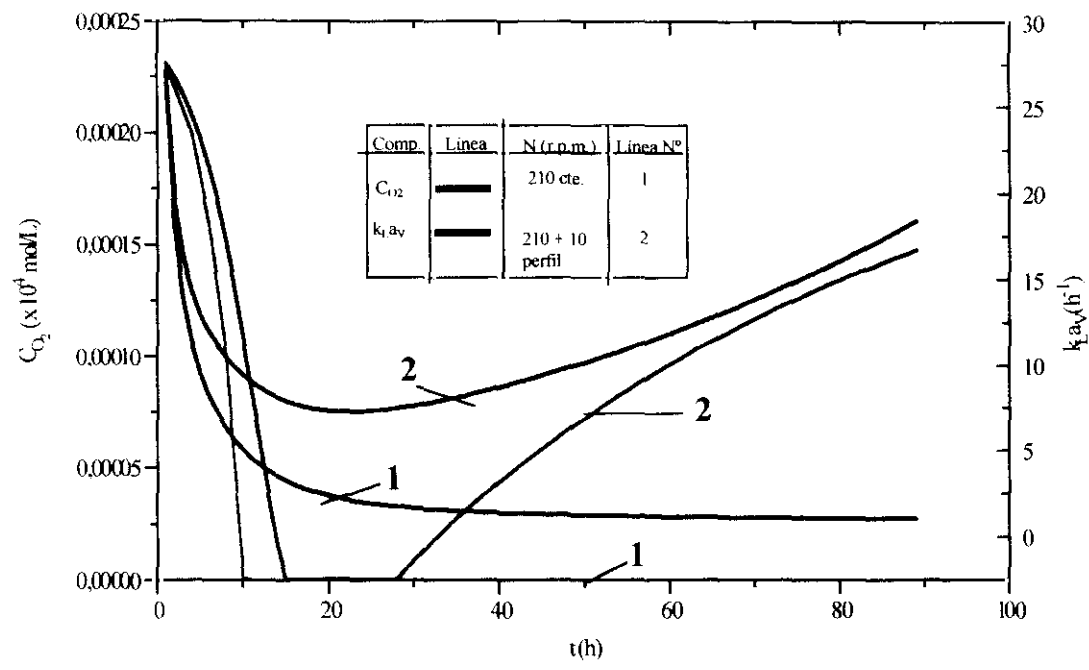


Figura 4.24.- Simulación realizada para la producción de xantano en operación en discontinuo con el Modelo Cinético no estructurado: influencia de la velocidad de agitación sobre la evolución de oxígeno disuelto y $k_L a_v$.

4.3.3.- Validez del Modelo Cinético No Estructurado

A lo largo de este apartado se han ido exponiendo los diferentes resultados obtenidos con el MCNE propuesto, tanto en ajustes a datos experimentales como en las distintas simulaciones. Se ha visto que se ha conseguido un buen resultado al aplicar el MCNE a los diferentes experimentos realizados en este trabajo en las evoluciones de biomasa, xantano y sacarosa; sin embargo, este modelo es incapaz de predecir una buena evolución del oxígeno y del amonio.

Se ha planteado un modelo cinético no estructurado en función de la temperatura (T) de acuerdo a la tendencia que presentaban algunos de los parámetros obtenidos en los distintos experimentos. No obstante, al reproducir los datos con el citado modelo en función de temperatura, se observó que las reproducciones obtenidas con el MCNE(T) no son suficientemente buenas.

Para la otra variable estudiada, es decir la concentración inicial de amonio, no fue posible siquiera obtener una relación de este tipo, pues los parámetros obtenidos del ajuste con el MCNE no presentaban una tendencia capaz de responder a alguna función matemática que permitiese plantear un MCNE(NH₄⁺).

Las simulaciones fueron realizadas tomando como parámetros los obtenidos por ajuste del experimento central –aquel realizado con las condiciones óptimas (Santos,1993)–. Se han realizado las simulaciones oportunas con el fin de observar la validez del modelo planteado.

Al comparar los resultados obtenidos a partir de las diferentes simulaciones con los resultados experimentales, se ha podido llegar a las siguientes conclusiones respecto a lo que el Modelo Cinético No Estructurado es capaz de predecir:

- La **concentración de xantano** se ve influida por la concentración inicial de amonio, observándose un máximo en la producción a 257 p.p.m de amonio, sin embargo el modelo no lo predice.

- La **concentración de oxígeno** en el medio se ve influida por la concentración de xantano formado, el modelo es incapaz de predecir la evolución de oxígeno disuelto según aumenta la concentración de polisacárido, ni tampoco predecir esta evolución según se va aumentando la velocidad de agitación.
- El modelo es capaz de predecir bien la influencia de la **concentración de sacarosa inicial** sobre la evolución de la concentración de polisacárido, en cambio es incapaz de predecir de forma adecuada la influencia del azúcar en la evolución de la biomasa.

Por todo ello, se puede concluir que el modelo cinético no estructurado permite predecir bien la influencia de azúcar inicial en el medio, y la influencia de la biomasa inicial, en cambio no permite obtener buenas predicciones de la evolución de oxígeno disuelto, variable se suma importancia en este proceso. Así pues, el Modelo Cinético No Estructurado no es suficiente para la descripción de la producción de xantano. Se hace, pues, necesario mejorar el modelo de modo que se consiga una mejora en las predicciones de las evoluciones de los componentes. Ello implica tener en cuenta en el modelo factores que influyen en el proceso y, que no han sido considerados hasta el momento. En el próximo apartado se aplicará un modelo cinético más complejo, esto es un Modelo Cinético Metabólico que, es de esperar, mejore significativamente la descripción de la producción de xantano.

5.- MODELO CINÉTICO

METABÓLICO

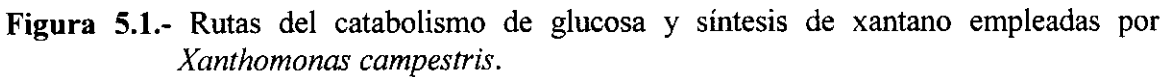
5.- MODELO CINÉTICO METABÓLICO

Como ya se ha visto, los modelos cinéticos no estructurados son buenos para describir el sistema cuando la composición celular está aproximadamente en estado estacionario o no es necesario tener en cuenta la influencia de ciertas variables en los valores de los parámetros. Sin embargo, en una situación en la tienen lugar cambios en la composición celular, los modelos no estructurados proporcionan una pobre aproximación a la realidad. Por otra parte, es lógico pensar que los modelos no estructurados no sean capaces de reflejar la influencia de ciertas variables, fundamentalmente la composición del medio, tal como ha quedado reflejado en el apartado anterior. Para salvar estas debilidades en este tipo de casos, hay que recurrir a los modelos estructurados.

Estos últimos fueron clasificados por Nielsen y Villadsen (1992) en varios tipos, tal como se detalló en el primer capítulo de esta Memoria. Dentro de esta clasificación, se encuentran los Modelos Cinéticos Metabólicos (MCM), los cuales no estructuran la biomasa, pero plantean relaciones estequiométricas definidas para el metabolismo del sustrato carbonado (Koga y col. 1969; Hall y Barford 1981; Barford y col. 1992).

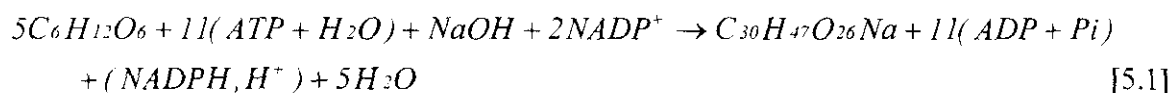
En la literatura hay diversos Modelos Cinéticos Metabólicos (MCM), entendidos como aquellos que hacen un tipo de estructuración sólo para el metabolismo del o de los sustratos carbonados, sin diferenciar partes en la biomasa, ya que la siguen considerando como en los modelos no estructurados. Dentro de este tipo, existen modelos muy diferentes, muchos de ellos propuestos para problemas muy específicos de forma teórica (Van Dedem y Moo-Young, 1973; Gerasts y col., 1990; Bibila y Flickinger, 1991), realizando simulaciones a partir de parámetros estimados de forma que no queda muy clara. Otros autores plantean estudios metabólicos más generales, como es el caso de Koga y col., (1969) y del grupo de Bardford (Barford y col., 1990; Hall y Bardford, 1981 Bardford y Hall 1981; Bardford y col., 1992a y 1992b), estos últimos autores proponen este tipo de modelos para el caso específico de *Saccharomyces cerevisiae*.

El único modelo de tipo metabólico propuesto en la literatura para la producción de xantano es el planteado por Pons y col. (1989). Este modelo fue formulado con datos obtenidos en operación tipo batch y en un reactor tipo columna de burbujeo. Consideran la biomasa como una entidad independiente en el sistema, el crecimiento es considerado como no estructurado; sin embargo se estructura la producción de xantano, es decir, el modelo tiene en cuenta el metabolismo del sustrato carbonado en el metabolismo celular. La Figura 5.1 muestra la interrelación entre la síntesis del xantano y el catabolismo de la glucosa vía Entner-Doudoroff en conjunción con el ciclo de Krebs. Las dos rutas no son independientes debido a que los sustituyentes de la molécula de xantano, acetato y piruvato, presumiblemente derivan del acetilCoA y del fosfoenolpiruvato (PEP). En dicho esquema se muestra además dónde se requieren o generan los compuestos de alta energía (ATP, GTP) y sus precursores (cofactores reducidos, $\text{NADH}, \text{H}^+ \text{FADH}_2$).

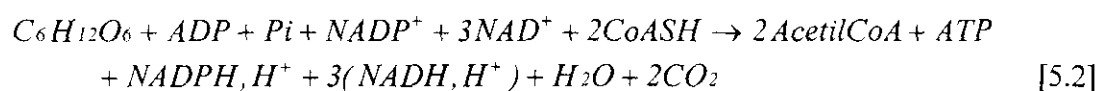


Las relaciones estequiométricas planteadas por estos autores para la evolución de los diferentes componentes son las siguientes:

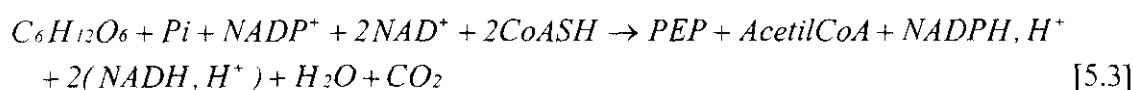
Para la **síntesis de xantano**, Pons y col. (1989) proponen tres relaciones estequiométricas. La primera establece la síntesis del esqueleto carbonado conteniendo cuatro hexosas (dos manosas y dos glucosas) y una de ácido glucurónico:



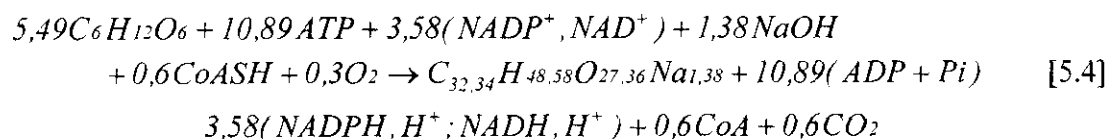
La segunda ecuación describe la síntesis de Acetil CoA, el precursor del constituyente acetato:



El piruvato es directamente obtenido a partir del fosfoenolpiruvato (PEP):

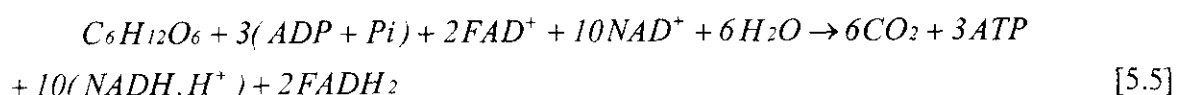


Las ecuaciones [5.1] y [5.3] son multiplicadas por los coeficientes estequiométricos que estos autores han extraído de la literatura, y se muestran la siguiente ecuación:



Para la producción de xantano, se considera que el peso molecular del monómero de xantano corresponde a una fórmula empírica: $C_{32,34}H_{48,58}O_{27,36}Na_{1,38}$, por lo que su peso molecular es 906,2 g/mol.

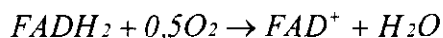
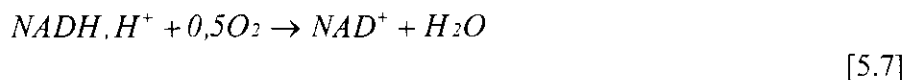
Para el **catabolismo total de la glucosa**, considerando que la ruta catabólica es la de Entner-Doudoroff en conjunción con el ciclo de Krebs, se asume :



La energía de **mantenimiento** se formula como:



Para la **fosforilación oxidativa** :



Las velocidades específicas de crecimiento de las ecuaciones [5.4] a [5.7] son, respectivamente q'_x , q'_c , q'_m , q'_r y q'_p . La relación entre las ecuaciones [5.6] y [5.7] puede expresarse como la relación q'_p / q'_r , siendo la relación P/O o número de moléculas de ATP formadas durante la transferencia de un par de electrones a través de la cadena respiratoria hacia el oxígeno, que es el aceptor final de estos electrones en los organismos aerobios.

Pons y col. (1989) plantean relaciones estequiométricas para diferentes componentes del sistema:

Velocidad de **consumo de glucosa**:

$$q'_g = q'_c + 5,49 \cdot q'_x \quad [5.8]$$

Velocidad de **producción de CO₂**:

$$q'_{CO_2} = q'_c + 0,6 \cdot q'_x \quad [5.9]$$

Velocidad de **consumo de oxígeno**:

$$q'_{O_2} = 0,5 \cdot q'_r \quad [5.10]$$

Velocidad de **transferencia de oxígeno**:

$$q'_{O_2} = \frac{k_L a_{O_2}}{C_{bMax}(C^* - C_{O_2})} \quad [5.11]$$

Velocidad de **producción de cofactores**:

$$q'_r = 3,58 \cdot q'_x + 12 \cdot q'_c \quad [5.12]$$

Velocidad de **consumo de ATP**:

$$q'_{ATP} = 10,89 \cdot q'_X + q'_m \quad [5.13]$$

Velocidad de **producción de ATP**:

$$q'_{ATP} = 3 \cdot q'_C + q'_P \quad [5.14]$$

Se asume estado pseudoestacionario para cofactores y balances de ATP. Las 7 ecuaciones ([5.8] a [5.14]) del modelo implican 10 incógnitas, donde nueve son velocidades específicas $q'_g, q'_C, q'_X, q'_{CO2}, q'_{O2}, q'_r, q'_p, q'_m, q'_{ATP}$ y la concentración de oxígeno disuelto.

Un aspecto importante que consideran estos autores es el mecanismo para la energía de mantenimiento, proponiendo que el consumo de energía para este mantenimiento podría proporcionar rendimientos teóricos de xantano Y_{g-x} entre 0,9 y 0,77 g de xantano/g de glucosa para valores de P/O en un rango entre 3-0,5 respectivamente. Esto no parece apoyar los resultados experimentales, los cuales no exceden de 0,7 g de xantano/g de glucosa

Entre las suposiciones del modelo hay que considerar:

- El requerimiento de ATP para la síntesis de xantano ($10,89q'_X$) no iguala la velocidad de síntesis q'_{ATP} puesto que la demanda de ATP para mantenimiento q'_m es positivo.
- Asumen que los requerimientos de ATP para el mantenimiento son proporcionales al requerimiento para la síntesis de xantano, lo cual rinde:

$$F = \frac{q'_m}{q'_X} \quad [5.15]$$

Si se sustituye la ecuación [5.15] en la [5.13] se obtiene la ecuación [5.16]:

$$\frac{q'_{ATP}}{q'_X} = 10,89 + F \quad [5.16]$$

Esta ecuación indica que la cantidad de ATP implicado en la síntesis de xantano es mayor que la cantidad que estequiométricamente predice la ecuación [5.4].

- Los resultados experimentales muestran la clara influencia del coeficiente de transferencia de oxígeno sobre las velocidades específicas. Esto debe ser expresado a través de la limitación de oxígeno sobre la velocidad específica acoplada al consumo de oxígeno, de acuerdo a:

$$q'_r = \frac{q'_{rM} \cdot C_{O_2}}{(K_C + C_{O_2})} \quad [5.17]$$

Cuando el oxígeno no es limitante, se obtiene el valor máximo, q'_{rM} . Cuando el oxígeno es limitante, es decir su concentración es cercana a cero, la ecuación [5.17] queda como:

$$q'_r = \frac{q'_{rM} \cdot C_{O_2}}{K_C} \quad [5.18]$$

- La relación final está basada en las investigaciones de Röels (1983). La relación P/O de 3 es estequiométricamente poco realista para los organismos en vivo. El valor P/O debe ser más pequeño debido a la fosforilación oxidativa. Basados en la condición de Röels de no limitación de oxígeno, el valor más alto de P/O es de 1,2 mol ATP/mol de cofactor. Por tanto, Pons y col. (1989) asumen que la relación entre la tensión de oxígeno y P/O es funcionalmente similar a la relación entre tensión de oxígeno y la velocidad de respiración:

$$\frac{q'_P}{q'_r} = \frac{1,2 \cdot C_{O_2}}{(K_C + C_{O_2})} \quad [5.19]$$

Las ecuaciones [5.16], [5.17] y [5.18] introducen tres nuevos coeficientes F , q'_{rM} y K_C . La constante de Michaelis, K_C , es estimada como el valor más bajo de tensión de oxígeno disuelto (2% de saturación de aire corresponde a $K_C = 4,6 \cdot 10^{-6}$ mol/L). El coeficiente q'_{rM} es calculado a partir de la velocidad específica máxima de producción de xantano en tanque agitado con limitación de oxígeno ($q'_{XM}=0,25$ g de xantano/g biomasa h) el correspondiente valor de $q'_{rM}=8 \cdot 10^{-3}$ mol NAD^+ /g biomasa h. Finalmente, el valor de F es estimado en 23 mol de xantano/mol de ATP empleado para mantenimiento. Esto rinde un valor de Y'_{X-ATP} de 34 mol ATP/mol de xantano y una importante eficiencia en el *turnover* de ATP en xantano de $10,89/34=0,32$.

Por tanto, el modelo propuesto por Pons y col. (1989) se puede escribir, adaptándolo al método utilizado en esta Memoria:

Evolución de **biomasa**:

$$\frac{dC_b}{dt} = r_b \quad [5.20]$$

Evolución de **xantano**:

$$\frac{dC_X}{dt} = r_X \quad [5.21]$$

Evolución de **glucosa**:

$$\frac{dC_g}{dt} = r_g \quad [5.22]$$

Evolución de **oxígeno**:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = k_L a_V (C^* - C_{O_2}) - r'_{O_2} \quad [5.23]$$

Asumiendo estado pseudoestacionario para la concentración de oxígeno disuelto:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = 0 \quad [5.24]$$

Las velocidades de reacción planteadas para las reacciones del esquema, en el que intervienen la biomasa, el sustrato carbonado, oxígeno y dióxido de carbono son:

Para la **biomasa**:

$$r'_X = C_b \cdot q'_r \cdot \frac{(1 + 4 \cdot Y'_{r-p})}{(3,58 + 4 \cdot Y'_{r-ATP})} \quad [5.25]$$

Para la **glucosa**:

$$r'_g = C_b \cdot q'_r \cdot \frac{(5,49 + 20,77 \cdot Y'_{r-p} + (\frac{Y'_{X-ATP}}{3}))}{(3,58 + 4 \cdot Y'_{r-ATP})} \quad [5.26]$$

Para el **oxígeno**:

$$r'_{O_2} = 0,5 \cdot C_b \cdot q'_r \quad [5.27]$$

Para el **dióxido de carbono**:

$$r'_{CO_2} = 0,3 \cdot r'_X + \frac{C_b \cdot q'_r}{12} \quad [5.28]$$

Las ecuaciones cinéticas del modelo las plantean de la siguiente forma:

$$r_b = \mu_M \cdot C_b \cdot \left(\frac{1 - C_b}{C_{b_{max}}} \right) \quad [5.29]$$

$$q'_r = q'_{rM} \cdot C_{O_2} / (K_C - C_{O_2}) \quad [5.30]$$

$$Y'_{r-p} = 1,2 \cdot C_{O_2} / (K_C - C_{O_2}) \quad [5.31]$$

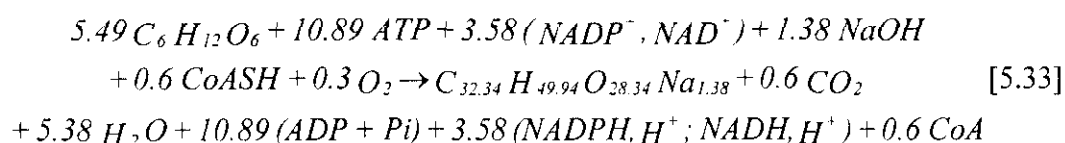
$$C_{b_{max}} = 6,35 \cdot \Delta C_b - C_{b0} \quad [5.32]$$

Pons y col. (1989) sólo realizan ajuste de datos experimentales de la biomasa para la cual emplean la ecuación logística. Para el resto de componentes realizan sólo una simulación. Para la integración de las ecuaciones diferenciales emplean el algoritmo de Runge-Kutta de cuarto orden. Al comparar los resultados obtenidos de la simulación del modelo con los resultados experimentales confirman la validez del modelo propuesto.

Pons y col. (1989) plantean el modelo que se ha descrito para un reactor tipo columna de burbujeo, por ello, no es posible la aplicación directa de este modelo propuesto a los datos experimentales obtenidos en el presente trabajo. Unido a esto, tampoco realizaban un ajuste de los datos experimentales para obtener los parámetros del modelo. Por esto, se ha formulado un modelo cinético metabólico para la producción de xantano en un tanque agitado, teniendo en cuenta para ello algunas de las consideraciones planteadas en el Modelo Metabólico propuesto por Pons y col. (1989).

5.1.- FORMULACIÓN DEL MODELO

En este caso, al igual que en el anterior, el modelo propuesto describe el crecimiento del microorganismo mediante la ecuación logística, como función de la concentración de nitrógeno. Sin embargo, el modelo estructura la producción de xantano, es decir el modelo es metabólicamente estructurado, pues tiene en cuenta el metabolismo de la fuente de carbono dentro de la célula. Se han tomado todas las relaciones estequiométricas propuestas por Pons y col. (1989) a excepción de la planteada para el xantano, pues el peso molecular medio del precursor de xantano no es 906,2, como suponen estos autores, sino que es próximo a 923 por lo que la relación estequiométrica para la **producción de xantano** queda conforme a la ecuación [5.33]:



Las relaciones estequiométricas para el catabolismo total de la glucosa, energía de mantenimiento y fosforilación oxidativa, vienen dadas por las ecuaciones [5.5], [5.6] y [5.7], propuestas por Pons y col. (1989).

Por tanto, las velocidades de producción de los componentes, suponiendo que toda la sacarosa -sustrato carbonado empleado en este trabajo- es asumido en las ecuaciones como glucosa, son:

$$\frac{dC_s}{dt} = -5.49 \cdot r_1 - r_2 \quad [5.34]$$

$$\frac{dC_p}{dt} = r_1 \quad [5.35]$$

$$\frac{dC_{ATP}}{dt} = -10.89 \cdot r_1 + 3 \cdot r_2 - r_3 + r_5 \quad [5.36]$$

$$\frac{dC_{CoF}}{dt} = 3.58 \cdot r_1 + 12 \cdot r_2 - r_4 \quad [5.37]$$

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = -0.3 \cdot r_1 - 0.5 \cdot r_4 + k_L a_V \cdot (C^* - C_{O_2}) \quad [5.38]$$

Según Pons y col (1989) la cinética de la reacción dada por la ecuación [5.7] es:

$$r_4 = \frac{k_4 \cdot C_{O_2}}{K_4 + C_{O_2}} \cdot C_X \quad [5.39]$$

Para la reacción de la ecuación [5.33], la producción de xantano, Pons y col. (1989) proponen:

$$r_1 = r_4 \cdot \left[\frac{1 + 4 \cdot Y'_{rp}}{3,58 + 4 \cdot Y_{ATP, P}} \right] \quad [5.40]$$

Suponiendo estado pseudoestacionario para los cofactores:

$$\frac{dC_{Cof}}{dt} = 0 = 3,58 \cdot r_1 + 12 \cdot r_2 - r_4 \quad [5.41]$$

Sustituyendo en esta última ecuación las ecuaciones [5.39] y [5.40] y despejando r_2 , se obtiene:

$$r_2 = \frac{r_4}{12} \cdot \left[1 - 3,58 \left(\frac{1 + 4 \cdot Y'_{rp}}{3,58 + 4 \cdot Y_{ATP, P}} \right) \right] \quad [5.42]$$

Por tanto, las velocidades de reacción quedan de la siguiente forma:

$$r_x = k_X \cdot \left(\frac{C_{X_0}}{Y_{XN}} + C_{N_0} \right) \cdot C_X \cdot \left(1 - \frac{\tau_X}{C_{X_0} + Y_{XN} \cdot C_{N_0}} \right) \quad [5.43]$$

$$r_1 = \frac{k_4 \cdot C_{O_2}}{K_4 + C_{O_2}} \cdot C_X \cdot \left(\frac{1 + 4 \cdot Y_{rp}}{3,58 + 4 \cdot Y_{ATPP}} \right) \quad [5.44]$$

$$r_2 = \frac{1}{12} \cdot \frac{k_4 \cdot C_{O_2}}{K_4 + C_{O_2}} \cdot C_X \cdot \left(1 - 3,58 \cdot \left(\frac{1 + 4 \cdot Y_{rp}}{3,58 + 4 \cdot Y_{ATPP}} \right) \right) \quad [5.45]$$

Los valores de Y_{rp} y Y_{ATPP} se han fijado en los propuestos por Pons y col. (1989):

$$Y_{rp} = 1,2 \cdot \frac{C_{O_2}}{K_4 + C_{O_2}} \quad [5.46]$$

$$Y_{ATPP} \approx 34 \quad [5.47]$$

Quedando así el modelo cinético metabólico (MCM), formado por el siguiente grupo de ecuaciones diferenciales:

Para la **biomasa**:

$$\frac{dC_X}{dt} = k_X \cdot \left(\frac{C_{X_0}}{Y_{XN}} + C_{N_0} \right) \cdot C_X \cdot \left(1 - \frac{C_X}{C_{X_0} + Y_{XN} \cdot C_{N_0}} \right) \quad [5.48]$$

Para el **azúcar**:

$$\frac{dC_S}{dt} = 180 \cdot \left\{ -\frac{5,94}{923,2} \cdot \frac{dC_P}{dt} - \frac{1}{12} \cdot \frac{k_4 \cdot C_{O_2}}{K_4 + C_{O_2}} \cdot C_X \cdot \left[1 - 3,58 \cdot \left(\frac{1 + 4 \cdot Y_{rp}}{3,58 + 4 \cdot Y_{ATPP}} \right) \right] \right\} - \frac{1}{Y_{XS}} \cdot \frac{dC_X}{dt} \quad [5.49]$$

Para el **producto**:

$$\frac{dC_P}{dt} = 923,2 \cdot \frac{k_4 \cdot C_{O_2}}{K_4 + C_{O_2}} \cdot \left(\frac{1 + 4 \cdot Y_{rp}}{3,58 + 4 \cdot Y_{ATPP}} \right) \cdot C_X \quad [5.50]$$

Para la evolución de **oxígeno disuelto**:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = -\frac{0,3}{923,2} \cdot \frac{dC_P}{dt} - 0,5 \cdot \frac{k_4 \cdot C_{O_2}}{K_4 + C_{O_2}} \cdot C_X + k_L a_v \cdot (C^* - C_{O_2}) - \frac{1}{Y_{OX}} \cdot \frac{dC_X}{dt} \quad [5.51]$$

El valor del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno se ha calculado empleando la misma correlación que para el MNE, que viene dado por la ecuación [4.23].

Por tanto, el Modelo Cinético Metabólico propuesto tiene de siete parámetros, los representativos de la biomasa : k_X y Y_{XN} -obtenidos de la misma forma que en el MNE- y los parámetros correspondientes a la evolución de azúcar, xantano y oxígeno disuelto: k_4 , K_4 , Y_{XS} , Y_{OX} . En este caso, la aplicación del MCM a los datos experimentales para la obtención de los parámetros se realizó de la siguiente forma:

- Primero se realizó el cálculo de los parámetros relacionados con el crecimiento: k_X e Y_{XN} . Estos parámetros se obtienen mediante regresión no lineal en simple respuesta aplicada a la ecuación [5.48] (estos ajustes son, por tanto, los mismos que los realizados en el capítulo anterior del MCNE, por lo que no se volverán a exponer).
- Luego se aplicó una regresión no lineal en múltiple-respuesta a las ecuaciones [5.49] a [5.51], obteniendo así los valores de los parámetros k_4 , K_4 , Y_{XS} and Y_{OX} . Debido a que los datos experimentales de la fuente carbonada y del xantano eran 105 dos órdenes de magnitud mayores que la concentración de oxígeno disuelto, es necesario pesar los residuos para optimizar el valor de los parámetros. Además, en la ecuación [4.23], correspondiente a la correlación del coeficiente volumétrico de oxígeno, es necesario sustituir la ecuación correspondiente de calibrado de la concentración de xantano en función de la viscosidad para cada experimento.

5.2.- AJUSTE DE LOS DATOS EXPERIMENTALES

Para la aplicación del modelo cinético metabólico planteado se han realizado los ajustes de los experimentos del 1 al 7. Al efectuar el ajuste de los datos experimentales obtenidos, se observó que el modelo era incapaz de ajustar los datos de ciertos experimentos debido a la falta de convergencia del algoritmo. En la Tabla 5.1 se muestran los resultados de los parámetros físicos y estadísticos de los experimentos donde se pudo aplicar el MCM.

Todos los ajustes realizados han proporcionado niveles de confianza superiores al 95%, hay que apuntar que los valores obtenidos para el parámetro K_4 son mucho más altos que la concentración de oxígeno disuelto, por lo que las ecuaciones [5.39] y [5.46], pueden ser simplificadas a orden 1 de la siguiente manera:

$$r_4 = \frac{k_4 \cdot C_{O_2}}{K_4 + C_{O_2}} \cdot C_X \approx k \cdot C_{O_2} \cdot C_X \quad [5.52]$$

$$Y_{rp} = 1,2 \cdot \frac{C_{O_2}}{K_4 + C_{O_2}} \approx k' \cdot C_{O_2} \quad [5.53]$$

Los datos experimentales fueron nuevamente ajustados, teniendo en cuenta estas modificaciones. Para diferenciar el modelo en el que r_4 e Y_{rp} son ecuaciones de orden 1 respecto al anterior que aparecían con cinéticas tipo Monod se denominó a este modelo como Modelo Cinético Metabólico Simplificado (MCMS).

En las Tablas 5.2 a 5.8 se recogen los valores de los parámetros físicos y estadísticos obtenidos de la aplicación del MCMS a los experimentos del 1 al 7. Las Figuras 5.2 a 5.8 muestran las reproducciones del modelo correspondientes a cada experimento al realizar dicho ajuste. En estas figuras, la línea continua representa la reproducción obtenida de la aplicación del modelo mientras que los símbolos indican los puntos experimentales.

En la Tabla 5.2 se muestran los parámetros obtenidos por ajuste del **experimento nº 1**, realizado a **25 °C** y con **257 p.p.m. de amonio inicial**, como puede observarse, todos los parámetros obtenidos cumplen las restricciones estadísticas impuestas, todos los parámetros presentan intervalos de confianza estrechos, presentando valores tanto de la *t* de Student como de la *F* de Fischer elevados. En cuanto a la reproducción de los datos experimentales reflejada en la Figura 5.2, se observa que para este experimento el modelo predice de forma adecuada

tanto la evolución de la concentración de xantano como la concentración de sacarosa. Para el oxígeno, si bien no es tan bueno, el valor teórico mejora notablemente la reproducción obtenida con el MCNE, como se puede comprobar en la Figura 4.2 del capítulo anterior.

Los parámetros obtenidos del ajuste del **experimento n° 2**, es decir el realizado en las condiciones óptimas de producción: **28 °C y 257 p.p.m de amonio** (Santos, 1993), aparecen en la Tabla 5.3. Todos los parámetros obtenidos rinden intervalos de confianza superiores al 95%, si bien hay que apuntar que el valor de t de Student del parámetro Y_{OX} es relativamente bajo. El ajuste de los datos experimentales obtenido para este experimento es significativamente mejor que el que se obtuvo para el mismo experimento con el MCNE. Para este experimento, el MCMS muestra una excelente reproducción de la evolución de los tres componentes (sacarosa, xantano y oxígeno disuelto) tal como se observa en la Figura 5.3.

En la Tabla 5.4 se muestran los parámetros obtenidos de la aplicación de modelo experimento realizado a **31°C y con 257 p.p.m. de amonio inicial (experimento n° 3)**. Al igual que en los dos experimentos anteriores, se cumplen las condiciones estadísticas para la t de Student y la F de Fischer. Se obtiene una buena reproducción de los datos experimentales de la evolución de oxígeno disuelto, de la concentración de xantano y de sacarosa, tal como puede observarse en la Figura 5.4.

En cuanto al **experimento n° 4**, realizado a **34 °C y con 257 p.p.m. de amonio inicial**, se observa que el valor del parámetro k' (Tabla 5.5) es significativamente elevado en comparación con el que presenta en los experimentos anteriores, mostrando un valor de t de Student mucho menor que el obtenido en los ajustes de los experimentos realizados a otras temperaturas. La reproducción obtenida (Figura 5.5) no es tan buena como en los dos casos anteriores, pero supera con mucho a la obtenida con el MCNE.

En la Tabla 5.6 aparecen los valores de todos los parámetros obtenidos al aplicar el MCMS al **experimento n° 5**, realizado a **28 °C con 65 p.p.m. de amonio**. En dicha tabla puede apreciarse que se cumplen las restricciones estadísticas, siendo el valor más bajo de t de Student el obtenido para el parámetro Y_{OX} . En cuanto a la reproducción de la evolución de los los componentes con este modelo, se obtiene una evolución de la concentración de sacarosa aceptable mientras que la evolución de la concentración de xantano y oxígeno disuelto difieren bastante de las obtenidas experimentalmente, tal como muestra la Figura 5.6.

Para el **experimento n° 6**, realizado a **28 °C** y con una concentración de amonio inicial de **130 p.p.m.**, vuelve a observarse que todos los parámetros superan los valores teóricos tabulados de *t* de Student y *F* de Fischer. En la Figura 5.7 aparecen las reproducciones de las evoluciones de los diferentes componentes obtenidas al aplicar el MCMS, en esta figura puede observarse un buen ajuste a los datos experimentales tanto de la concentración fuente carbonada, como de la concentración de xantano y del oxígeno disuelto.

La Tabla 5.8 muestra los parámetros obtenidos del ajuste al modelo para el experimento realizado a **28 °C** con **514 p.p.m. de amonio (experimento n° 7)**. Hay que destacar el valor significativamente alto del parámetro k' , el cual es aproximadamente 2 órdenes de magnitud superior al obtenido en el resto de experimentos. Además, el valor obtenido para la *t* de Student no supera el valor tabulado con un 95% de confianza. Otro parámetro en el que se obtiene un valor bajo de la *t* de Student es *k*, este parámetro entra dentro del límite teórico pero el valor es bajo en comparación con los experimentos anteriores. En cuanto a la reproducción de los datos experimentales, en la Figura 5.8 se observa una reproducción aceptable para la evolución de sacarosa, no siendo tan buena para la concentración de xantano ni para el oxígeno disuelto.

Tabla 5.1. -Valores físicos y estadísticos de los parámetros obtenidos mediante el ajuste de los datos de los experimentos 2, 3, y 4 al MCM.

T (°C)	Par.	Valores Parámetros			t Student		F Fischer		SRC
		Máx.	Ópt.	Mín.	Obtenido	Tabulado	Obtenido	Tabulado	
28	k_X	0,552	0,535	0,519	68,77	2,080	66984	3,47	$2,06 \cdot 10^{-3}$
	Y_{XN}	6,229	6,073	5,918	80,26				
	k_d	3,670	3,183	2,696	13,07	1,99	2778	2,48	2,09
	K_d	$5,97 \cdot 10^{-2}$	$5,95 \cdot 10^{-2}$	$5,94 \cdot 10^{-2}$	805,6				
	Y_{XS}	0,210	0,177	0,145	10,87				
	Y_{OX}	154,8	117,3	79,82	6,26				
31	k_X	0,472	0,446	0,421	36,71	2,145	4142	3,74	$1,41 \cdot 10^{-3}$
	Y_{XN}	4,652	4,325	3,998	27,29				
	k_d	6,912	6,030	5,148	13,67	1,99	4188	2,48	1,76
	K_d	$6,66 \cdot 10^{-2}$	$6,66 \cdot 10^{-2}$	$6,66 \cdot 10^{-2}$	$1,38 \cdot 10^4$				
	Y_{XS}	0,168	0,155	0,143	24,80				
	Y_{OX}	37,55	33,55	29,55	16,77				
34	k_X	0,439	0,423	0,408	57,76	2,262	4263	4,26	$0,80 \cdot 10^{-3}$
	Y_{XN}	5,021	4,732	4,443	34,53				
	k_d	0,808	0,759	0,711	31,45	2,010	2780	2,54	2,10
	K_d	$3,76 \cdot 10^{-2}$	$3,75 \cdot 10^{-2}$	$3,74 \cdot 10^{-2}$	$1,9 \cdot 10^3$				
	Y_{XS}	0,153	0,130	0,107	11,29				
	Y_{OX}	34,87	31,29	27,71	17,54				

Tabla 5.2.- Parámetros físicos y estadísticos obtenidos por ajuste de los resultados del **experimento n° 1** al MCMS, realizado con *Xanthomonas campestris* a la temperatura de **25° C**, medio A (257 p.p.m. de amonio), programación de agitación (210 r.p.m. inicial).

T (°C)	Par.	Valores de los parámetros			t Student		F Fischer		SRC
		Máy	Ópt	Mín	Obtenido	Tabulado	Obtenido	Tabulado	
25	k _X	0,825	0,802	0,778	69,91	2,064	2460	3,40	5,60.10 ⁻³
	Y _{XN}	6,667	6,420	6,173	53,42				
	k	31,14	30,78	30,43	173,9	2,064	1397	2,78	5,72
	k'	2,77.10 ⁴	2,70.10 ⁴	2,63.10 ⁴	77,37				
	Y _{XS}	0,232	0,200	0,167	12,33				
	Y _{OX}	13,43	13,39	13,36	717,6				

Tabla 5.3.- Parámetros físicos y estadísticos obtenidos por ajuste de los resultados experimentales de experimento n° 2 al MCMS, realizado con *Xanthomonas campestris* a la temperatura de 28° C, medio A (257 p.p.m. de amonio), programación de agitación (210 r.p.m. inicial).

T (° C)	Par.	Valores de los parámetros			t Student		F Fischer		SRC
		Máx.	Ópt.	Mín.	Obt.enido	Tabulado	Obtenido	Tabulado	
28	k _X	0,552	0,535	0,519	68,77	2,064	6984	3,47	2,06.10 ⁻³
	Y _{XN}	6,229	6,073	5,918	80,26				
	k	66,05	54,45	42,85	9,39	2,069	2287	2,80	2,50
	k'	7,39.10 ⁴	6,35.10 ⁴	5,31.10 ⁴	12,19				
	Y _{XN}	0,197	0,176	0,155	16,77				
	Y _{OX}	256,5	157,9	59,35	3,204				

Tabla 5.4.- Parámetros físicos y estadísticos obtenidos por ajuste de los resultados experimentales de **experimento n° 3** al MCMS, realizado con *Xanthomonas campestris* a la temperatura de **31° C**, medio A (257 p.p.m. de amonio), programación de agitación (210 r.p.m. inicial).

T (°C)	Par.	Valores de los parámetros			t Student		F Fischer		SRC
		Máx.	Ópt.	Mín.	Obt.enido	Tabulado	Obtenido	Tabulado	
31	k _X	0,472	0,446	0,421	36,71	2,074	4142	3,38	1,41.10 ⁻³
	Y _{XN}	4,652	4,325	3,998	27,29				
	k	113,4	93,59	73,77	9,44	2,064	3549	2,82	2,06
	k'	5,79.10 ⁴	5,06.10 ⁴	4,3.10 ⁴	13,90				
	Y _{XS}	0,161	0,149	0,138	25,89				
	Y _{OX}	44,49	38,32	32,17	12,44				

Tabla 5.5.- Parámetros físicos y estadísticos obtenidos por ajuste de los resultados experimentales de **experimento n° 4** al MCMETS, realizado con *Xanthomonas campestris* a la temperatura de **34° C**, medio A (257 p.p.m. de amonio), programación de agitación (210 r.p.m. inicial).

T (°C)	Par.	Valores de los parámetros			t Student		F Fischer		SRC
		Máx.	Ópt.	Mín.	Obt.enido	Tabulado	Obt.enido	Tabulado	
34	k _X	0,439	0,423	0,408	57,76	2,074	4263	3,44	0,80.10 ⁻³
	Y _{XN}	5,021	4,732	4,443	34,53				
	k	17,33	11,93	6,527	4,433	2,131	3836	3,06	1,51
	k'	1,55.10 ⁵	1,05.10 ⁵	5,44.10 ⁴	4,165				
	Y _{XS}	0,165	0,140	0,115	11,28				
	Y _{OX}	32,73	28,47	24,21	13,43				

Tabla 5.6.- Parámetros físicos y estadísticos obtenidos por ajuste de los resultados experimentales de **experimento n° 5** al MCMETS, realizado con *Xanthomonas campestris* a la temperatura de **28° C**, medio A (**65 p.p.m. de amonio**), programación de agitación (210 r.p.m. inicial).

NH ₄ ⁺ (p.p.m.)	Par.	Valor del Parámetro			t Student		Fischer F		SRC
		Máx.	Ópt.	Mín.	Obtenido	Tabulado	Obtenido	Tabulado	
65	k _X	0,552	0,535	0,519	68,77	2,080	6984	3,47	2,06.10-3
	Y _{XN}	6,229	6,073	5,918	80,26				
	k	66,05	54,45	42,85	9,39	1,99	2287	2,48	2,50
	k'	7,39.10 ⁴	6,35.10 ⁴	5,31.10 ⁴	12,19				
	Y _{XS}	0,197	0,176	0,155	16,77				
	Y _{OX}	256,5	157,9	59,35	3,204				

Tabla 5.7.- Parámetros físicos y estadísticos obtenidos por ajuste de los resultados experimentales de **experimento n° 7** al MCMS, realizado con *Xanthomonas campestris* a la temperatura de **28° C**, medio A (**130 p.p.m. de amonio**), programación de agitación (210 r.p.m. inicial).

NH ₄ ⁺ (p.p.m.)	Par.	Valores de los parámetros			t Student		F Fischer		SRC
		Máx.	Ópt.	Mín.	Obt.enido	Tabulado	Obt.enido	Tabulado	
130	k _X	1,767	1,718	1,669	24,21	2,080	1262	3,47	5,2.10 ⁻²
	Y _{XN}	5,568	5,433	5,298	37,30				
	k	39,51	36,52	33,52	24,38	2,093	4642	2,90	2,50
	k'	1,03.10 ⁵	9,71.10 ⁴	9,09.10 ⁴	31,50				
	Y _{XN}	0,188	0,174	0,159	24,18				
	Y _{OX}	186,6	149,23	111,8	7,978				

Tabla 5.8.- Parámetros físicos y estadísticos obtenidos por ajuste de los resultados experimentales de **experimento n° 7** al MCMS, realizado con *Xanthomonas campestris* a la temperatura de **28° C**, medio A (**475 p.p.m.** de amonio), programación de agitación (210 r.p.m. inicial).

NH ₄ ⁺ (p.p.m.)	Par.	Valores de los parámetros			t Student		F Fischer		SRC
		Máy.	Ópt.	Mín.	Obtenido	Tabulado	Obtenido	Tabulado	
475	k _X	0,381	0,471	0,350	56,88	2,074	1603	3,44	0,80.10 ⁻³
	Y _{XN}	2,12	2,020	1,81	40,38				
	k	0,181	0,165	0,148	2,14	2,086	838,2	2,78	1,51
	k'	4,88.10 ⁷	3,34.10 ⁷	1,81.10 ⁷	2,02				
	Y _{XS}	0,345	0,119	0,104	15,84				
	Y _{OX}	575	386,2	198	4,21				

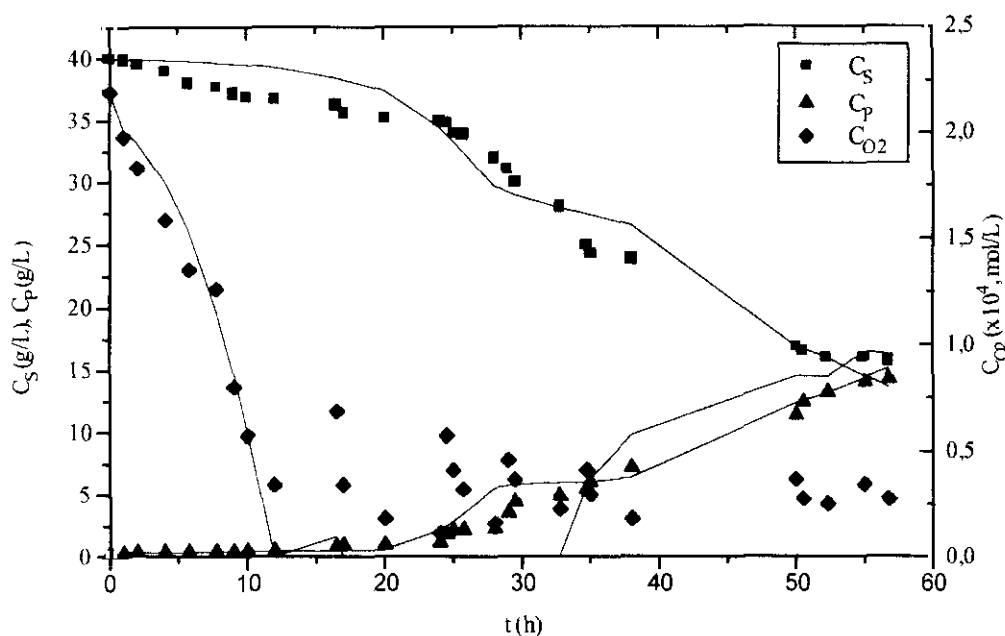


Figura 5.2.- Reproducción de los experimentales por ajuste por ajuste al MCMS del experimento n° 1, realizado con *Xanthomonas campestris* a la temperatura de 25° C, medio A (257 p.p.m. de amonio), programación de agitación (210 r.p.m. inicial).

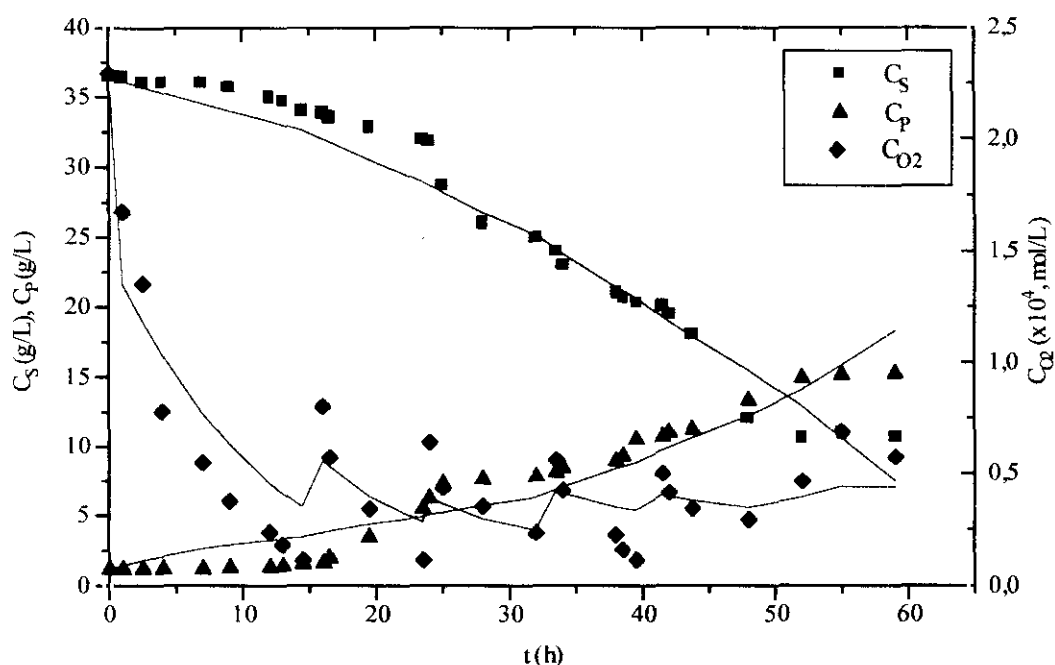


Figura 5.3.- Reproducción de los experimentales por ajuste por ajuste al MCMS del experimento n° 2, realizado con *Xanthomonas campestris* a la temperatura de 28° C, medio A (257 p.p.m. de amonio), programación de agitación (210 r.p.m. inicial).

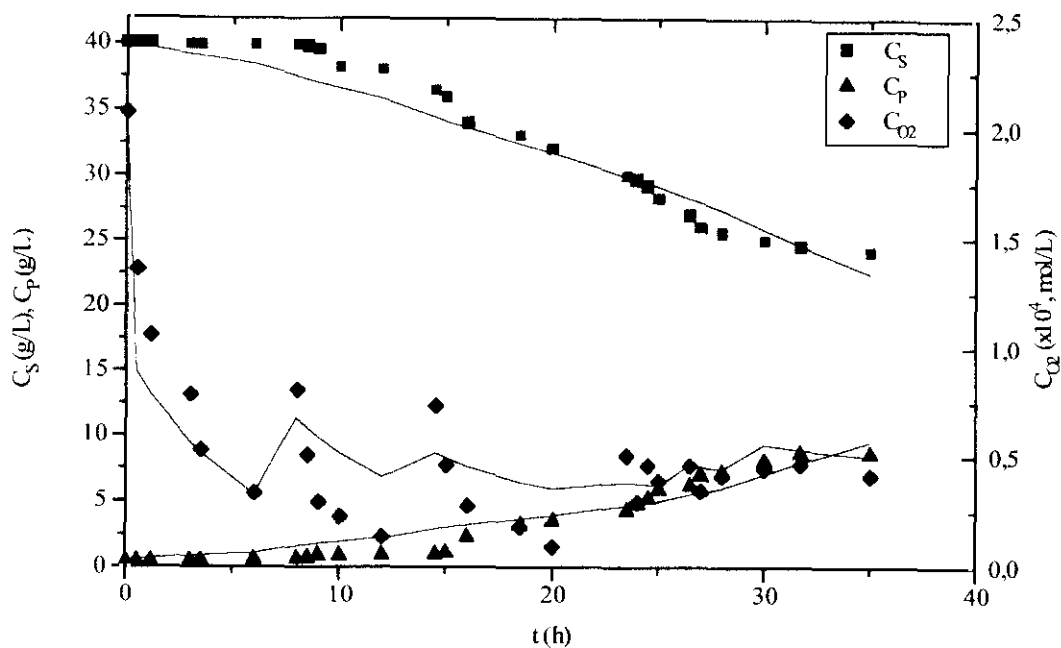


Figura 5.4.- Reproducción de los experimentales por ajuste al MCMS del experimento n° 3, realizado con *Xanthomonas campestris* a la temperatura de 31° C, medio A (257 p.p.m. de amonio), programación de agitación (210 r.p.m. inicial).

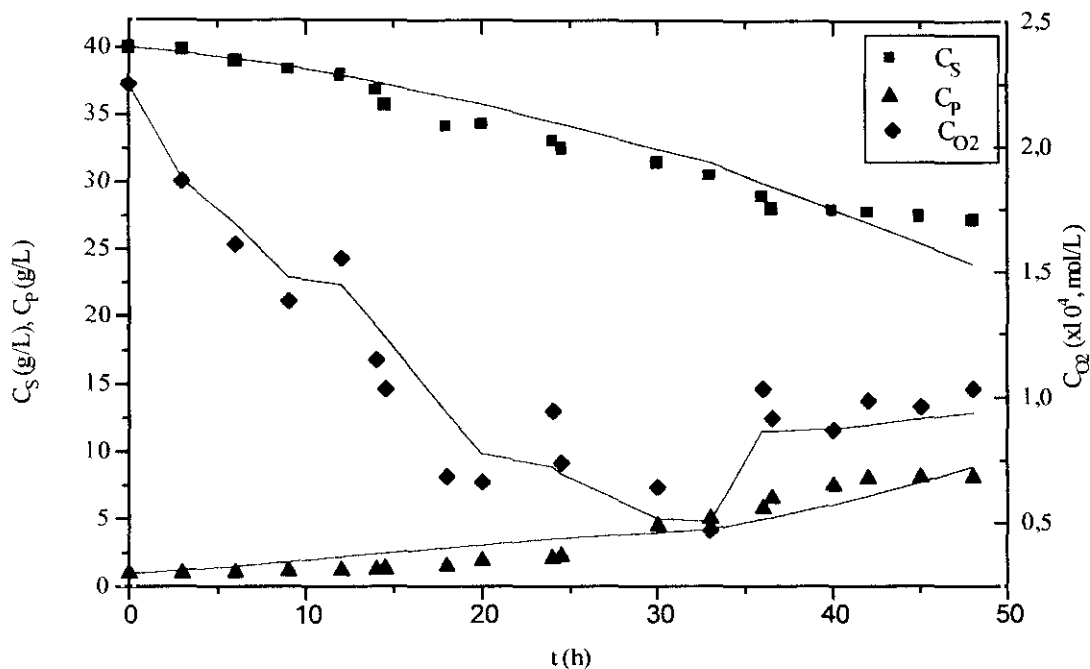


Figura 5.5.- Reproducción de los experimentales por ajuste al MCMS del experimento n° 4, realizado con *Xanthomonas campestris* a la temperatura de 34° C, medio A (257 p.p.m. de amonio), programación de agitación (210 r.p.m. inicial).

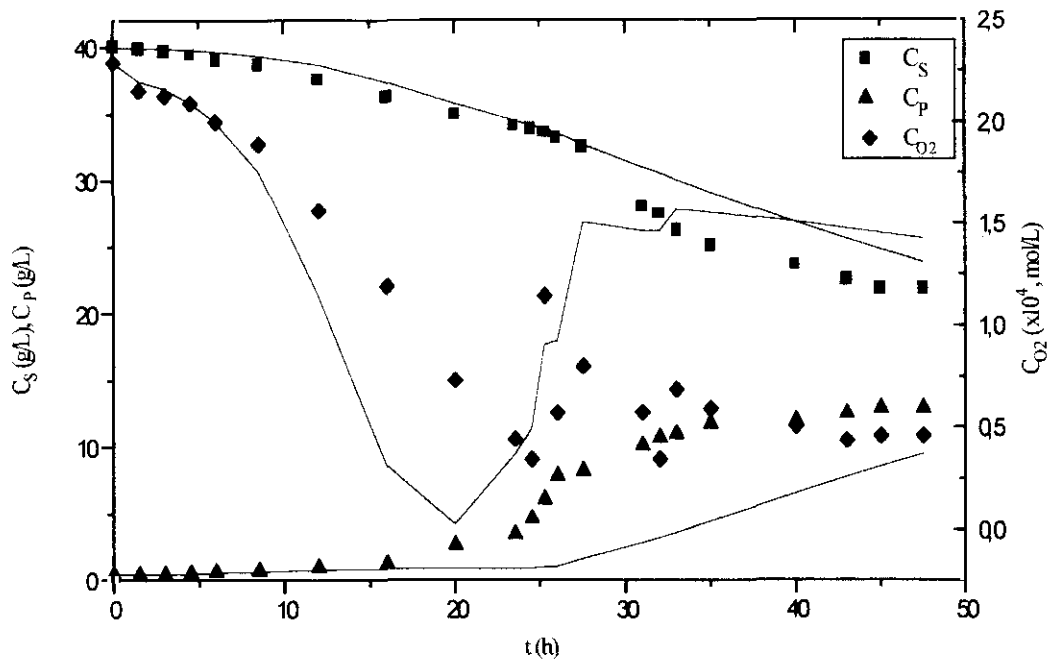


Figura 5.6.- Reproducción de los experimentales por ajuste por ajuste al MCMS del experimento n° 5, realizado con *Xanthomonas campestris* a la temperatura de 28° C, medio A (65 p.p.m. de amonio), programación de agitación (210 r.p.m. inicial).

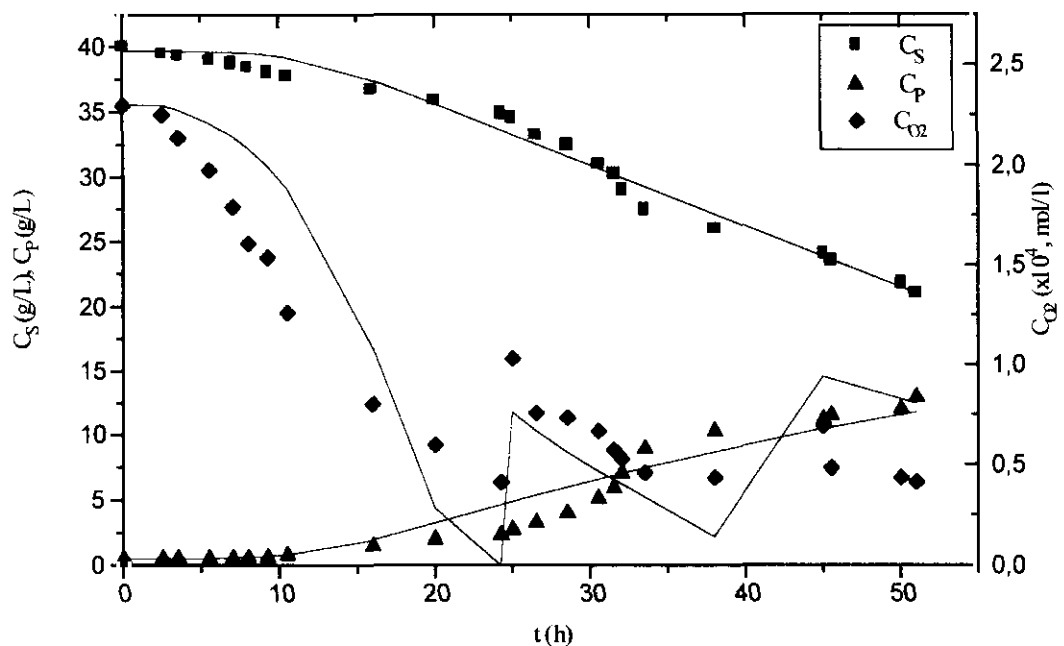


Figura 5.7.- Reproducción de los experimentales por ajuste por ajuste al MCMS del experimento n° 6, realizado con *Xanthomonas campestris* a la temperatura de 28° C, medio A (130 p.p.m. de amonio), programación de agitación (210 r.p.m. inicial).

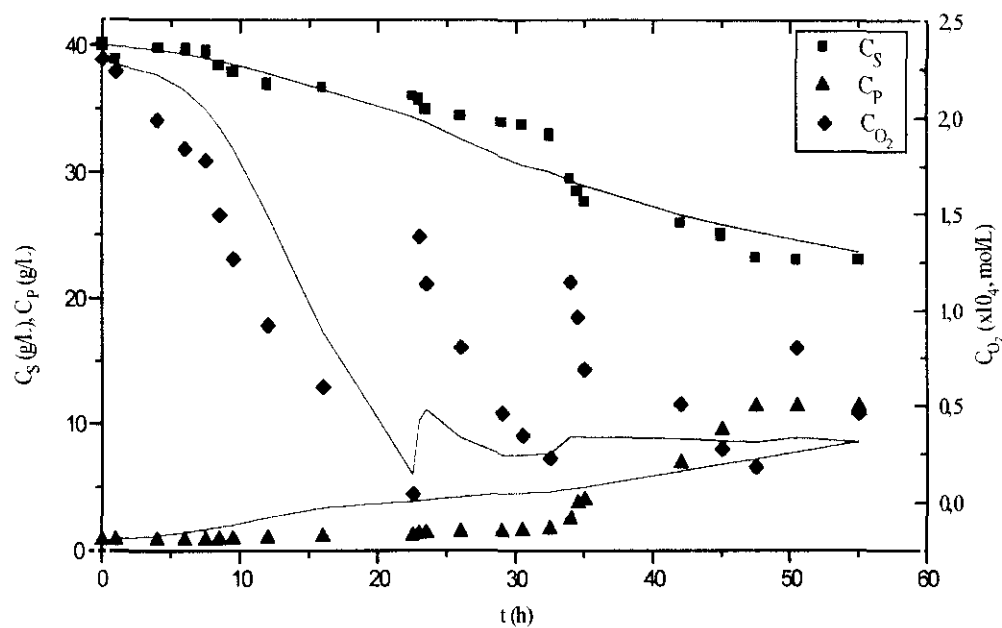


Figura 5.8.- Reproducción de los experimentales por ajuste por ajuste al MCMS del **experimento n° 7**, realizado con *Xanthomonas campestris* a la temperatura de 28° C, medio A (475 p.p.m. de amonio), programación de agitación (210 r.p.m. inicial).

5.3. DISCUSIÓN

5.3.1.- Variación del Valor de los Parámetros con las Variables

5.3.1.1.- Influencia de la Temperatura

En la Figura 5.9 se muestran las tendencias de los parámetros del modelo (MCMS) con la temperatura. No se han considerado los parámetros correspondientes al crecimiento debido a que la biomasa se ha considerado sin estructuración y, por tanto, los resultados son los mismos que en el MCNE, vistos en el capítulo anterior.

En cuanto a los parámetros correspondientes a la evolución de las concentraciones de sacarosa, xantano y de oxígeno disuelto obtenidos del ajuste de los datos a diferentes temperaturas, la tendencia presentada por los parámetros Y_{OX} y k es muy similar, ambos parámetros presentan un máximo, en torno a 28 °C para Y_{OX} y a 31° C para k . Los otros dos parámetros del modelo - Y_{XS} y k' presentan una tendencia lineal con la temperatura. El parámetro relativo a la velocidad de desaparición del azúcar, Y_{XS} , decrece, mientras que k' , parámetro relacionado con la velocidad de aparición del producto, aumenta con el incremento de dicha variable.

De acuerdo con estas tendencias, los cuatro experimentos han sido ajustados conjuntamente al MCMS, teniendo en cuenta la influencia de los parámetros con la temperatura, de la misma forma que se realizó para los parámetros del modelo MCNE, visto en el capítulo anterior.

Los parámetros k y Y_{OX} pueden ponerse como función de la temperatura de acuerdo con la expresión de Ratkowsky y col. (1983), dada en las ecuaciones [5.54] y [5.55], mientras que Y_{XS} y k' han sido ajustados a expresiones lineales (ecuaciones [5.56] y [5.57]).

El ajuste de todos los experimentos al MCMS (T) (Modelo Cinético Metabólico Simplificado en función de T) fue realizado en múltiple-respuesta, considerando como respuestas: sacarosa, xantano y oxígeno disuelto. Las tendencias presentadas por estos parámetros, así como el ajuste a las ecuaciones [5.54] a [5.57] se muestran en la Figura 5.9:

$$k(T) = \{ C_1 \cdot (T - T'_{min}) \cdot [1 - \exp(C_2 \cdot (T - T_{max}))] \}^2 \quad [5.54]$$

$$Y_{OX}(T) = \{ C'_1 \cdot (T - T'_{min}) \cdot [1 - \exp(C'_2 \cdot (T - T'_{max}))] \}^2 \quad [5.55]$$

$$Y_{XS} = \alpha + \beta \cdot T \quad [5.56]$$

$$k'(T) = \alpha + \beta \cdot T \quad [5.57]$$

Este modelo MCMS(T), tiene doce parámetros: C_1 , T_{min} , C_2 , T_{max} , C'_1 , T'_{min} , C'_2 , T'_{max} , α , β , α' y β' , tal como se indica en las ecuaciones anteriores. En la Tabla 5.9 aparecen los valores de los parámetros y sus estadísticas, obtenidos del ajuste de los cuatro experimentos realizados a diferentes temperaturas, donde los parámetros relativos a la fuente carbonada, al xantano y al oxígeno disuelto han sido puestos en función de la temperatura de la forma indicada. Como se observa, para todos los parámetros se cumplen las restricciones estadísticas superando siempre el valor teórico de *t* de Student y de *F* de Fischer.

Las tendencias obtenidas para estos cuatro parámetros cuando son ajustados conjuntamente, se mostraron en la Figura 5.9, donde el resultado de este ajuste era el representado por la línea continua. Este ajuste es el resultado de sustituir los valores de temperatura en las ecuaciones [5.54] a [5.57] con los valores de los parámetros obtenidos, de la siguiente forma:

$$k(T) = \{ 0,94 \cdot (T - 19,45) \cdot [1 - \exp(1,399 \cdot (T - 34,24))] \}^2 \quad [5.58]$$

$$k'(T) = -2,913 + 2,048 \cdot T \quad [5.59]$$

$$Y_{OX}(T) = \{ 0,571 \cdot (T - 24,35) \cdot [1 - \exp(-0,205 \cdot (T - 37,16))] \}^2 \quad [5.60]$$

$$Y_{XS}(T) = 0,340 + (-6,1 \cdot 10^{-3}) \cdot T \quad [5.61]$$

Todos los datos experimentales obtenidos en los experimentos llevados a cabo a diferentes temperaturas han sido reproducidos mediante sustitución en las ecuaciones [5.58] a [5.61] dentro del modelo cinético. Las Figuras 5.10 a 5.13 muestran una excelente reproducción de los resultados experimentales con el MCMS(T).

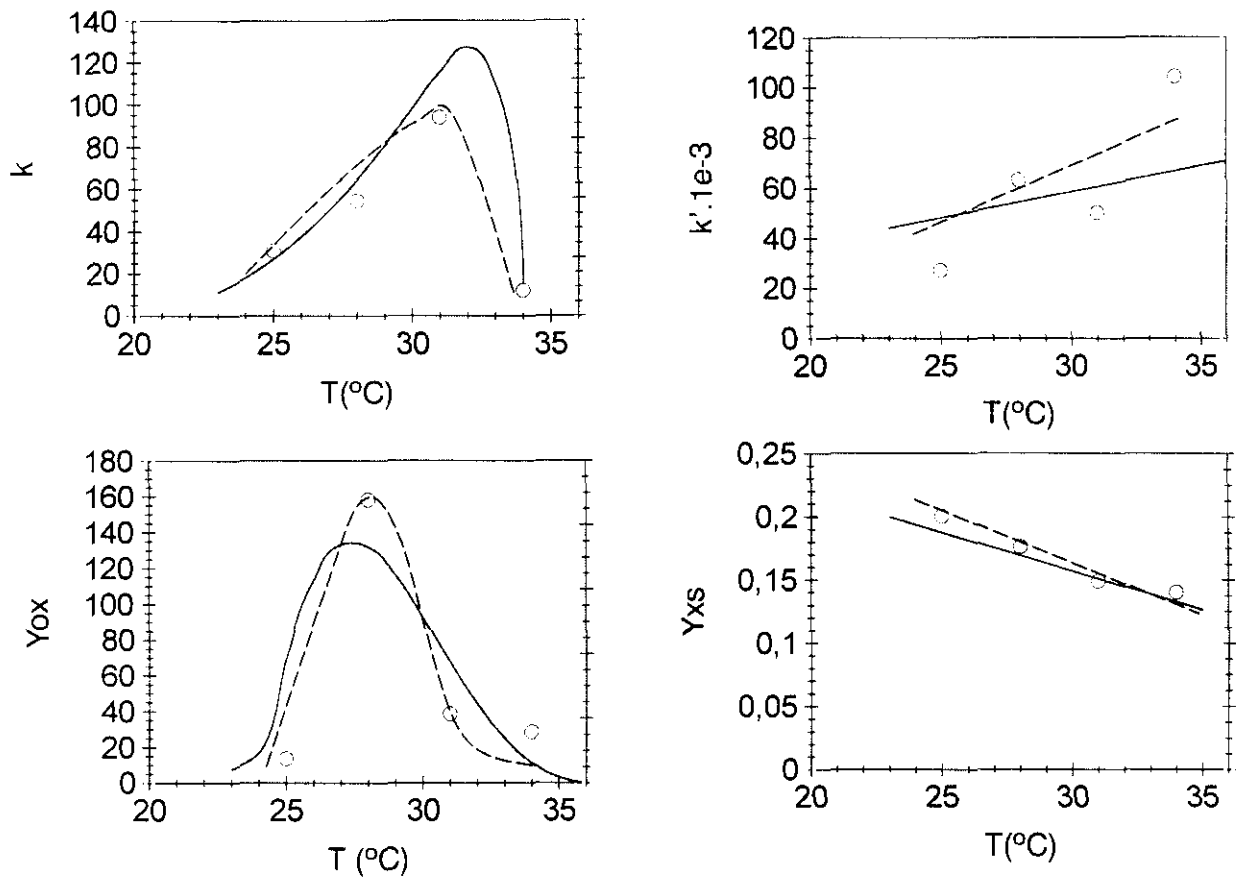


Figura 5.9- Evolución de los parámetros del MCMS con la temperatura. La línea discontinua indica la tendencia de los parámetros obtenidos experimento a experimento, la línea continua representa el ajuste a las ecuaciones [5.54] a [5.58].

Tabla 5.9- Valores físicos y estadísticos de los parámetros obtenidos mediante el ajuste de los datos experimentales de los experimento nº 1, 2, 3 y 4 al MCMS con doce parámetros.

Parámetros				T Student		F Fischer		SRC
	Máximo	Óptimo	Mínimo	Obtenido	Teórico	Obtenido	Teórico	
C_1	0,943	0,940	0,937	578,5	1,960	3592,7	1,79	3,81
T_{min}	19,56	19,45	19,33	340,5				
C_2	1,685	1,399	1,113	9,799				
T_{max}	34,25	34,24	34,22	6518,0				
α	0,445	0,340	0,235	6,456				
β	-2,6.10-3	-6,1.10-3	-9,6.10-3	-3,503				
C'_1	0,691	0,571	0,452	10,66				
T'_{min}	24,62	24,35	24,08	209,47				
C'_2	-0,184	-0,205	-0,225	-22,30				
T'_{max}	39,20	37,16	35,13	42,18				
α'	-1259	-2913	-4567	-3,522				
β'	2147	2048	1949	41,32				

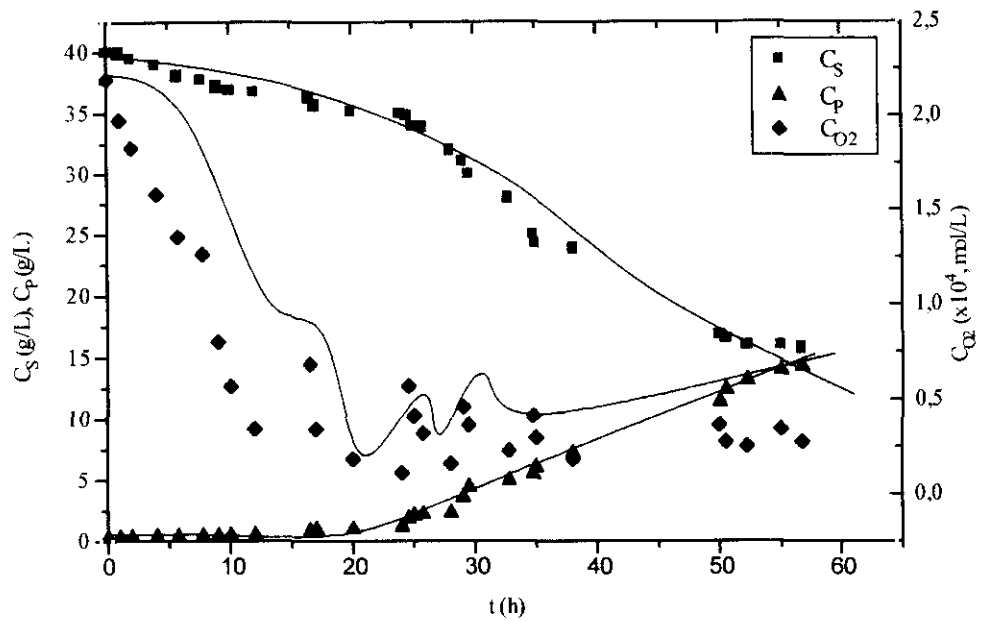


Figura 5.10.- Reproducción de los datos del **experimento n° 1** realizado a **25° C**, medio A (con **257 p.p.m.** de amonio) y programación de agitación (210 r.p.m.) al MCMS (T).

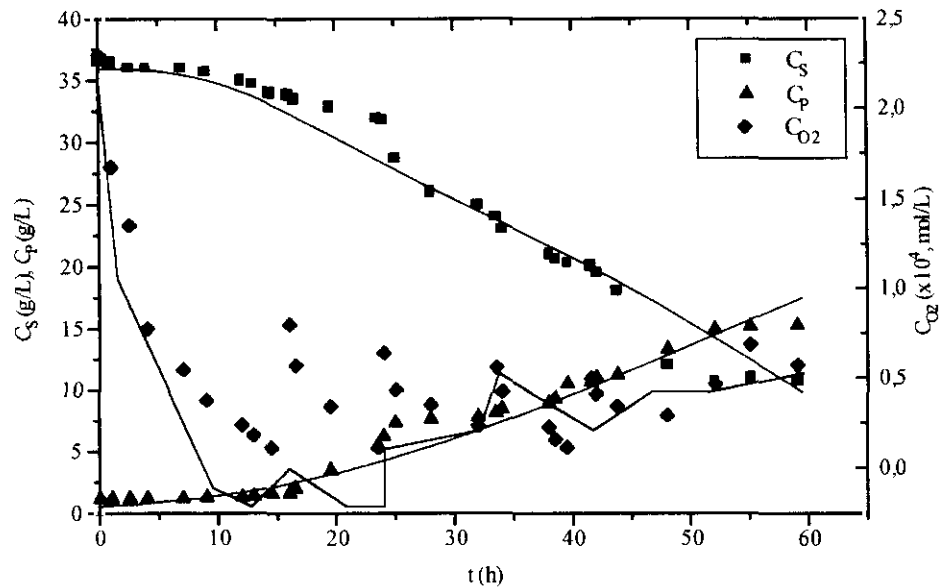


Figura 5.11.- Reproducción de los datos del **experimento n° 2** realizado a **28° C**, medio A (con **257 p.p.m.** de amonio) y programación de agitación (210 r.p.m.) al MCMS (T).

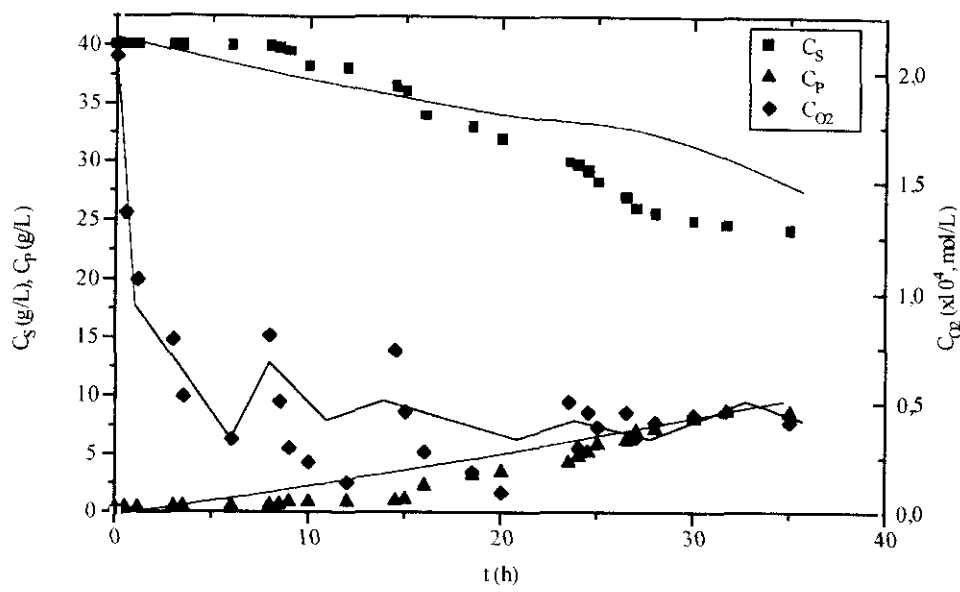


Figura 5.12.- Reproducción de los datos del experimento n° 3 realizado a 31° C, medio A (con 257 p.p.m. de amonio) y programación de agitación (210 r.p.m.) al MCMS (T).

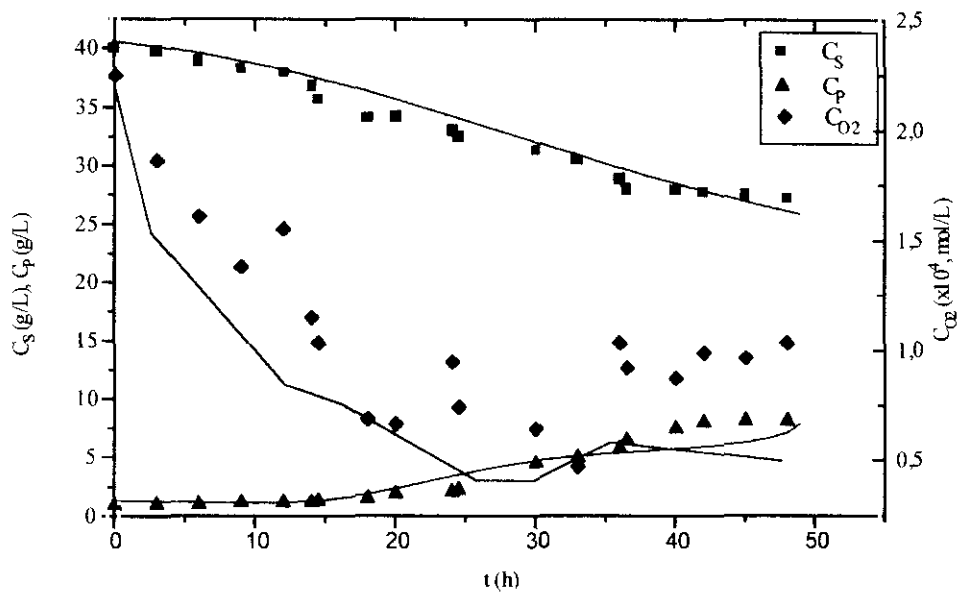


Figura 5.13.- Reproducción de los datos del experimento n° 4 realizado a 34° C, medio A (con 257 p.p.m. de amonio) y programación de agitación (210 r.p.m.) al MCMS (T).

5.3.1.2.- Influencia de la Concentración de Amonio

Como ya se vió anteriormente, el ajuste obtenido con el MCMS no permitió una buena reproducción de los datos experimentales de los experimentos realizados con 65 p.p.m. (experimento nº 6) y con 514 p.p.m. (experimento nº 7). Para el ajuste del experimento con 514 p.p.m. de amonio el valor del parámetro k' era muy elevado, y el valor de la t de Student para el citado parámetro era inferior al valor tabulado. Para el experimento realizado con 65 p.p.m., aunque se cumplían las condiciones estadísticas, se observó que la reproducción de la evolución de la concentración xantano y de la concentración del oxígeno no era buena.

Los experimentos llevados a cabo con 130 p.p.m. y 257 p.p.m. de amonio rendían buenos resultados, tanto desde un punto de vista estadístico, como en la reproducción de los resultados experimentales.

En la Figura 5.14 se muestra la evolución de los parámetros del MCMS con la concentración inicial de amonio empleada. Aunque para el caso de los parámetros k' e Y_{XS} (Figura 5.14-b y 5.14-d, respectivamente) parecen mostrar una tendencia que podría ajustarse a una función matemática tipo Ratkowsky, no ocurre lo mismo para los parámetros k e Y_{OX} (Figura 5.14a y 5.14c, respectivamente). Por ello, no resulta planteable ningún modelo (MCM) en función de la variable concentración inicial de amonio.

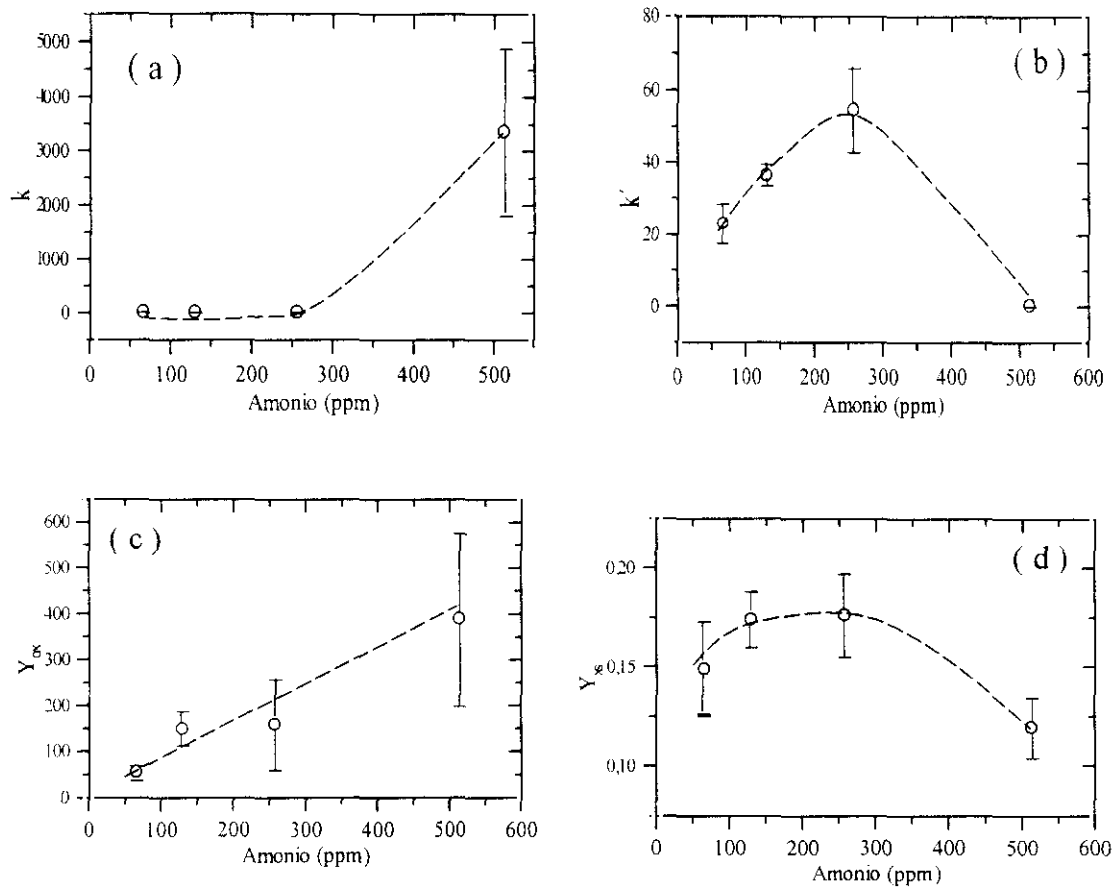


Figura 5.14.- Evolución de los parámetros del MCMS con la concentración de amonio inicial. La línea discontinua indica la tendencia de los parámetros obtenidos experimento a experimento.

5.3.2.- Simulación con el Modelo Cinético Metabólico

Ya fue comentado en el capítulo anterior la gran ventaja predictiva de realizar simulaciones, una vez comprobado que el modelo cinético objeto de estudio es válido.

En este capítulo se ha visto que el MCM ha podido ser obtenido en función de una de las variables estudiadas, concretamente, de la temperatura. En cambio no se ha planteado un modelo que tenga en cuenta la variación de la concentración inicial de amonio, lo cual es lógico si se tiene en cuenta que la concentración de amonio sólo influye en el crecimiento - biomasa- y, en el modelo planteado en este capítulo, se ha considerado este componente como no estructurado, esto es, expresado de la misma forma que en el MNE y, por consiguiente, mediante la ecuación logística.

Las simulaciones realizadas en este capítulo son las mismas que en el capítulo anterior. Se han realizado aquellas con las que, en principio, cabría esperar mayor influencia en la evolución de componentes, como biomasa inicial, concentración de azúcar inicial y concentración de oxígeno disuelto.

La **concentración de biomasa inicial** influye en la evolución de componentes del sistema. Esta concentración de biomasa inicial influye en primera instancia en la evolución de biomasa tal como contempla la ecuación [5.48] correspondiente a la ecuación logística para el crecimiento. Por consiguiente, influirá en la evolución de la sacarosa (ecuación [5.49]), de la concentración de xantano (ecuación [5.50]) y del oxígeno disuelto en el medio (ecuación [5.51]).

En cuanto al cambio de alguna condición que afecte a la evolución de **oxígeno disuelto**, en este modelo se verá la influencia no sólo en la evolución de este componente sino en la velocidad de producción de xantano, tal como se puede apreciar en la ecuación [5.50] y en la evolución de la concentración de azúcar, como se indica en la expresión dada por la ecuación [5.49].

Finalmente, la influencia de la **concentración inicial de sacarosa** se verá reflejada en la propia evolución del azúcar, tal como indica la expresión dada por la ecuación [5.49].

Por el contrario, en la evolución del producto no debe de influir, pues la ecuación que expresa la citada evolución (ecuación [5.50]), no presenta en su expresión la concentración del azúcar.

En la Tabla 5.10 se muestran las condiciones de operación empleadas en diferentes simulaciones que han sido realizadas con el MCM(T) en operación en discontinuo. Las simulaciones se han realizado cambiando el valor inicial de diversos factores cuya influencia en el proceso es de sobra conocida (Santos, 1993).

Los parámetros del modelo fueron obtenidos en función de la temperatura mediante expresiones dadas en las ecuaciones [5.58] y [5.61], pues la forma más adecuada de realizar simulaciones es teniendo en cuenta la influencia de las variables en los parámetros del modelo cinético planteado. Esto ha sido posible para los experimentos realizados a diferentes temperaturas pero no para la variable concentración de amonio como ya se ha comentado.

Tabla 5.10 .- Simulaciones realizadas con el MCMT (T) en operación

Simulación	Valores
Influencia de la biomasa inicial	$C_{X0} = 0,03 \text{ g/L}$ $C_{X0} = 0,07 \text{ g/L}$ $C_{X0} = 0,50 \text{ g/L}$ $C_{X0} = 1,00 \text{ g/L}$
Influencia del azúcar inicial	$C_{S0} = 10 \text{ g/l}$ $C_{S0} = 20 \text{ g/l}$ $C_{S0} = 40 \text{ g/l}$ $C_{S0} = 50 \text{ g/l}$
Influencia del porcentaje de Oxígeno Disuelto	$C_{O2} = 10\%$ $C_{O2} = 20\%$
Influencia de la agitación	Agitación constante Perfil de agitación

5.3.2.1.- Influencia de la Concentración Inicial de Biomasa

La influencia de la biomasa inicial en el **crecimiento**, a lo largo del tiempo de fermentación, se muestra en la Figura 5.15. Como puede observarse, cuanto mayor es la concentración inicial, mayor es la concentración máxima de biomasa al final de la fermentación.

En cuanto a la influencia sobre la velocidad de **producción de xantano y consumo de azúcar** se puede observar en la Figura 5.16, que el modelo predice un máximo para la producción de xantano. Es decir, de las cuatro concentraciones iniciales de biomasa inicial utilizadas en la simulación, el modelo predice un máximo de producción de xantano con la concentración inicial de 0,07 g/L. En cuanto a la evolución del azúcar, como es lógico, la tendencia guarda relación con la concentración de xantano, esto es, en aquellos casos en los que el modelo predice más xantano, también predice mayor consumo de la fuente carbonada y viceversa.

En la Figura 5.17 se observa la significativa mejora del MCMS(T) en cuanto a la simulación de la evolución de la concentración de oxígeno disuelto respecto a lo obtenido con el MCNE. En la citada Figura se observa que el valor del coeficiente de transferencia de oxígeno (k_{La}), es más bajo cuanto mayor es la concentración de xantano obtenido. La bajada de oxígeno disuelto también es mayor cuanto mayor es la producción del polisacárido.

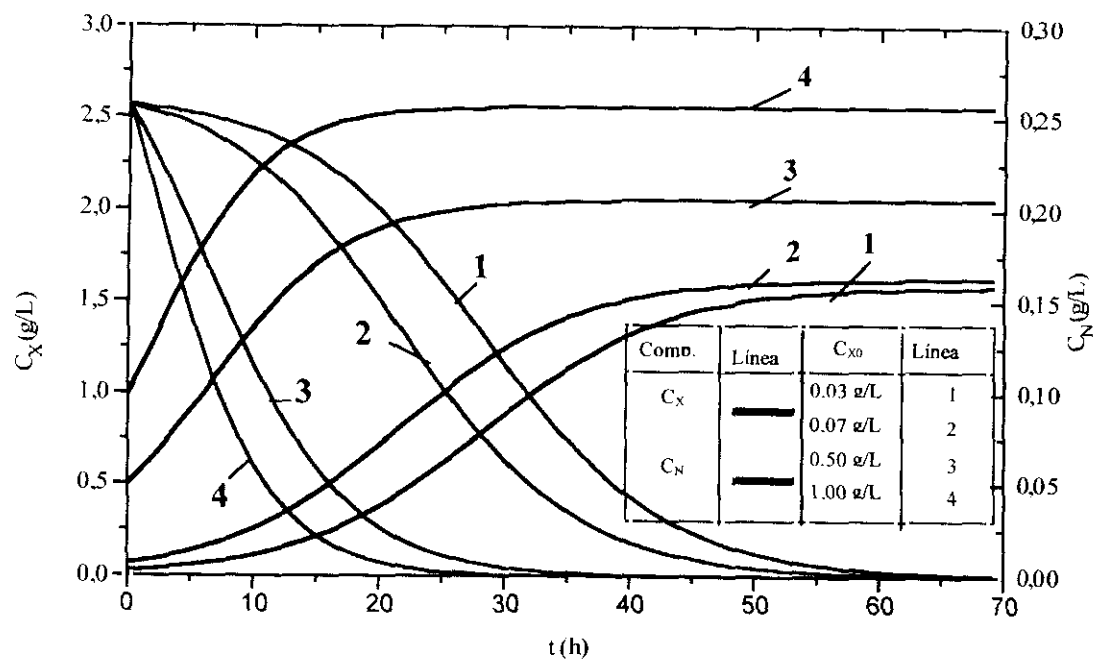


Figura 5.15.- Simulación MCMET con diferentes concentraciones iniciales de biomasa, influencia en la evolución de biomasa.

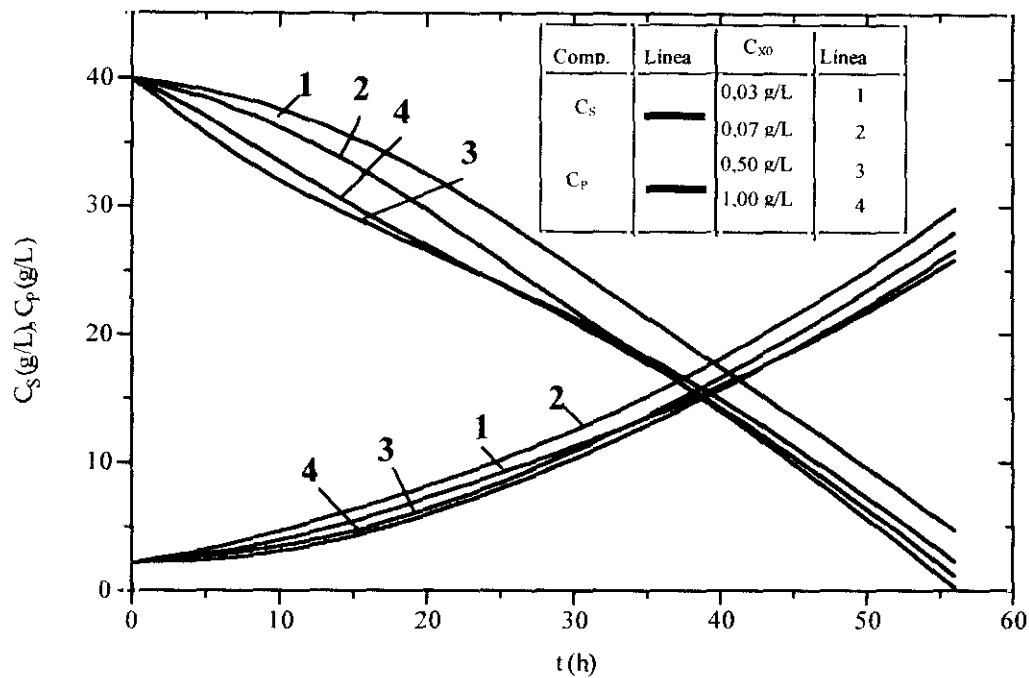


Figura 5.16.- Simulación MCMT con diferentes concentraciones iniciales de biomasa, influencia en la evolución de la concentración de xantano y de sacarosa.

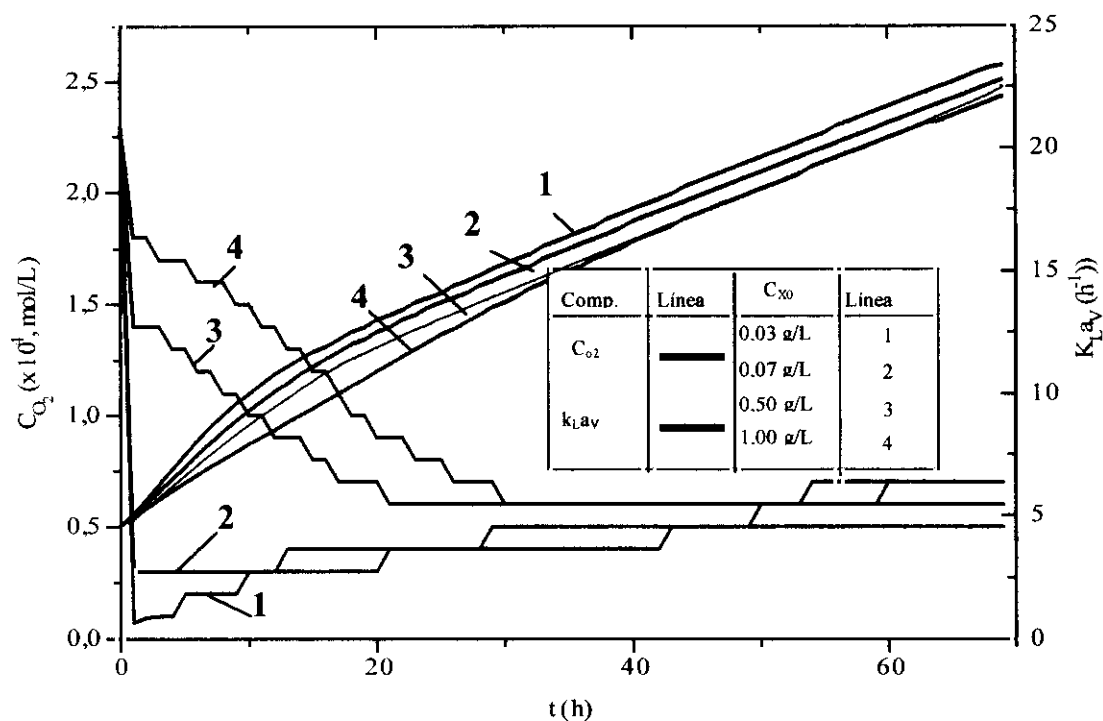


Figura 5.17.- Simulación MCMT con diferentes concentraciones iniciales de biomasa, influencia en la evolución del oxígeno disuelto y en la transferencia de oxígeno k_{La_v} .

5.3.2.2.- Influencia de la Concentración Inicial de Azúcar

Se han realizado simulaciones de cuatro operaciones con concentraciones iniciales diferentes de sacarosa, tal como se ha mostrado en la Tabla 5.10.

En cuanto a la influencia en el crecimiento, la Figura 5.18 muestra claramente que el modelo predice que la concentración inicial de sacarosa no influye en la velocidad del crecimiento, independientemente de la concentración inicial de la que se parta, ni la concentración de biomasa ni el consumo de la fuente nitrogenada, se ven afectados.

En la Figura 5.19 puede verse como influyen las diferentes concentraciones iniciales de azúcar sobre la velocidad de producción de xantano durante el proceso. El modelo es incapaz de predecir la influencia del azúcar en la evolución del producto, ya que la cantidad de xantano obtenida es siempre igual, independientemente de la concentración de azúcar de la que se parta.

La simulación para poner de manifiesto la influencia de la concentración inicial de azúcar en la evolución de oxígeno disuelto y el valor de k_{LaV} aparece en la Figura 5.20. En ella se observa que el MCMT no es capaz de predecir cambios en la evolución de dichos componentes al cambiar esta variable, lo cual es lógico, debido a que la concentración de l xantano, directamente relacionada con la viscosidad, no se ve influida por lo que el valor de k_{LaV} tampoco se verá afectado, ni por tanto la concentración de oxígeno disuelto.

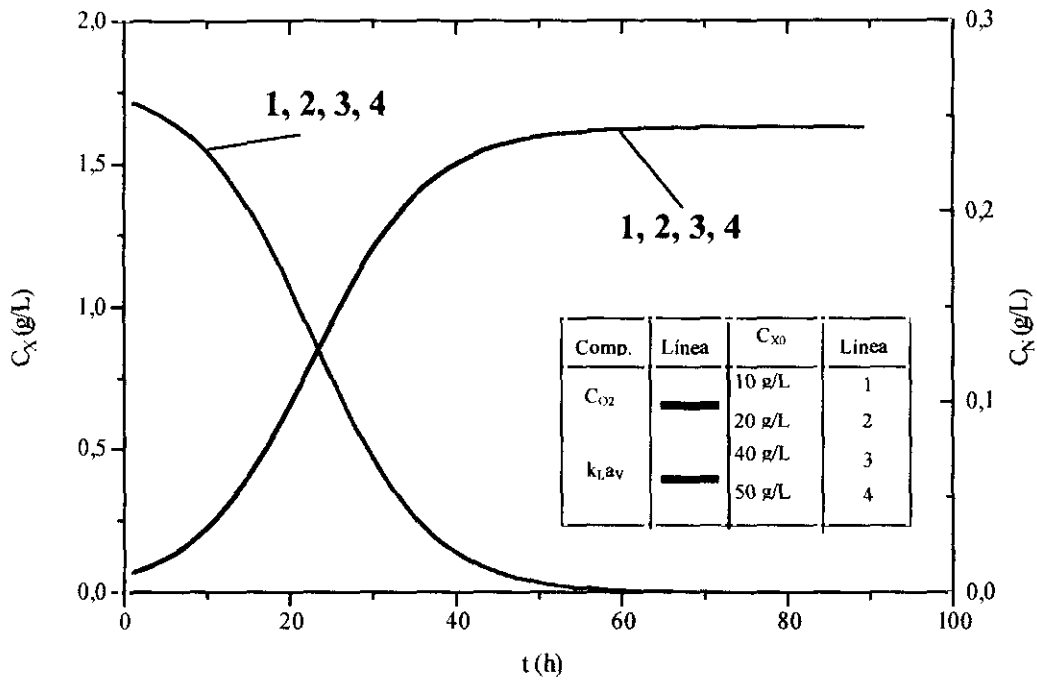


Figura 5.18.- Simulación MCNE con diferentes concentraciones iniciales de sacarosa, influencia en la evolución de la biomasa

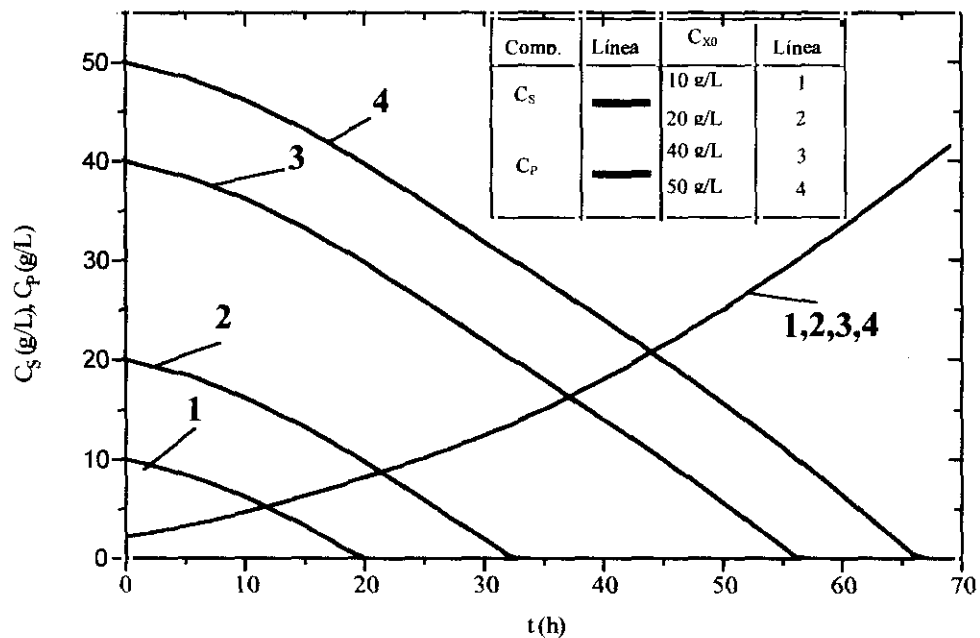


Figura 5.19.- Simulación MCMT con diferentes concentraciones iniciales de sacarosa, influencia en la evolución de sacarosa y xantano.

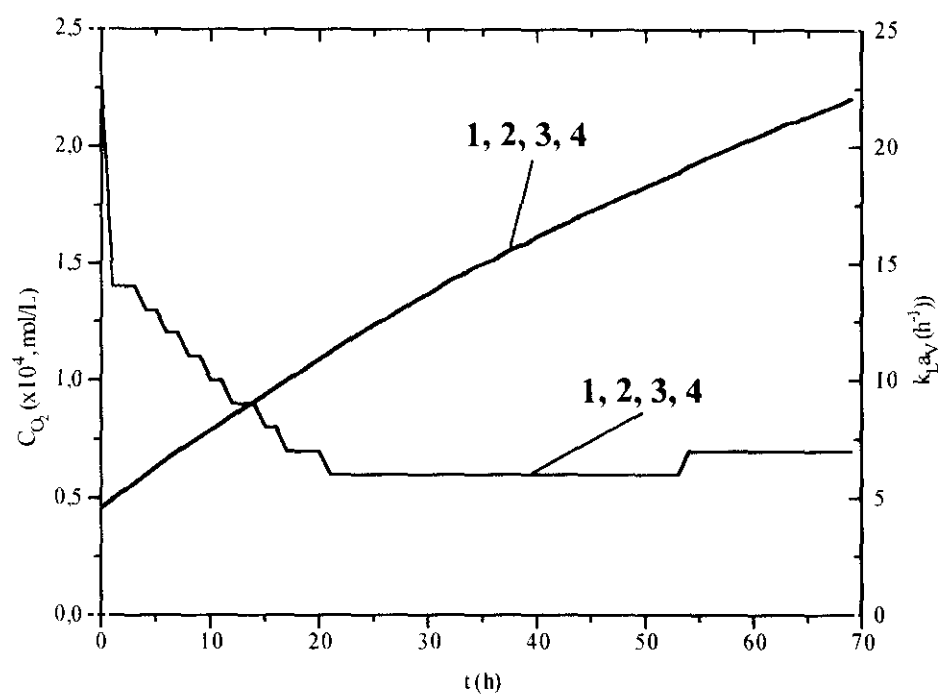


Figura 5.20.- Simulación MCMT con diferentes concentraciones iniciales de sacarosa, influencia en la evolución de la concentración de oxígeno disuelto y el valor de $k_L a_V$.

5.3.2.3.- Influencia de la Agitación y del porcentaje de Oxígeno Disuelto

En la Figura 5.21 se ofrece la influencia de la agitación. Se han realizado simulaciones con una agitación constante en todo el proceso y con un perfil de agitación. Puede apreciarse que al realizar la simulación con un perfil de agitación, se observa una mayor velocidad de producción de xantano. En cuanto a la evolución de la concentración de sacarosa, evidentemente, cuanto mayor es la velocidad de producción de xantano, se predice un mayor consumo de la fuente carbonada. La evolución de generación de la biomasa no se ve afectada por el tipo de agitación.

En la Figura 5.22 aparecen las simulaciones realizadas con diferentes concentraciones de oxígeno disuelto, con 10 y 20% del valor de saturación. Cuanto mayor es la concentración de oxígeno disuelto, el modelo predice una mayor concentración de xantano, y por tanto un mayor consumo de sacarosa. Al igual que en el caso anterior, la evolución de la concentración de biomasa no se ve afectada por la concentración de oxígeno disuelto.

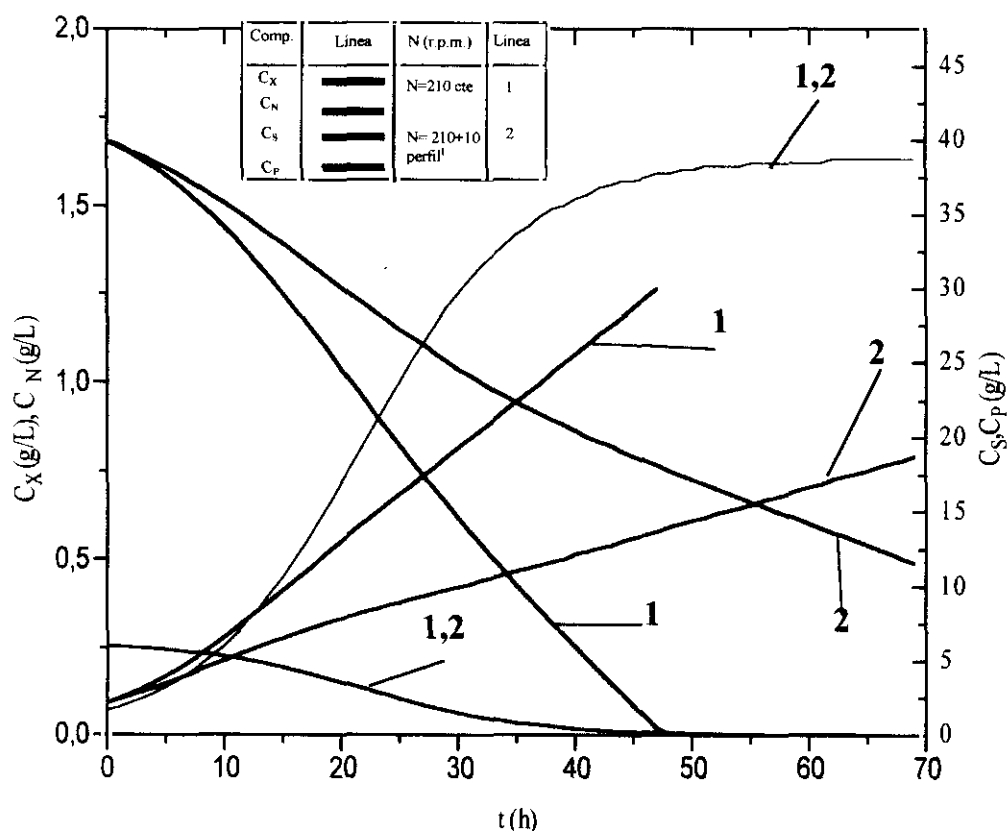


Figura 5.21.- Simulación MCMST con valores de $k_{L,av}$, influencia en la evolución de la biomasa, xantano y evolución de azúcar.

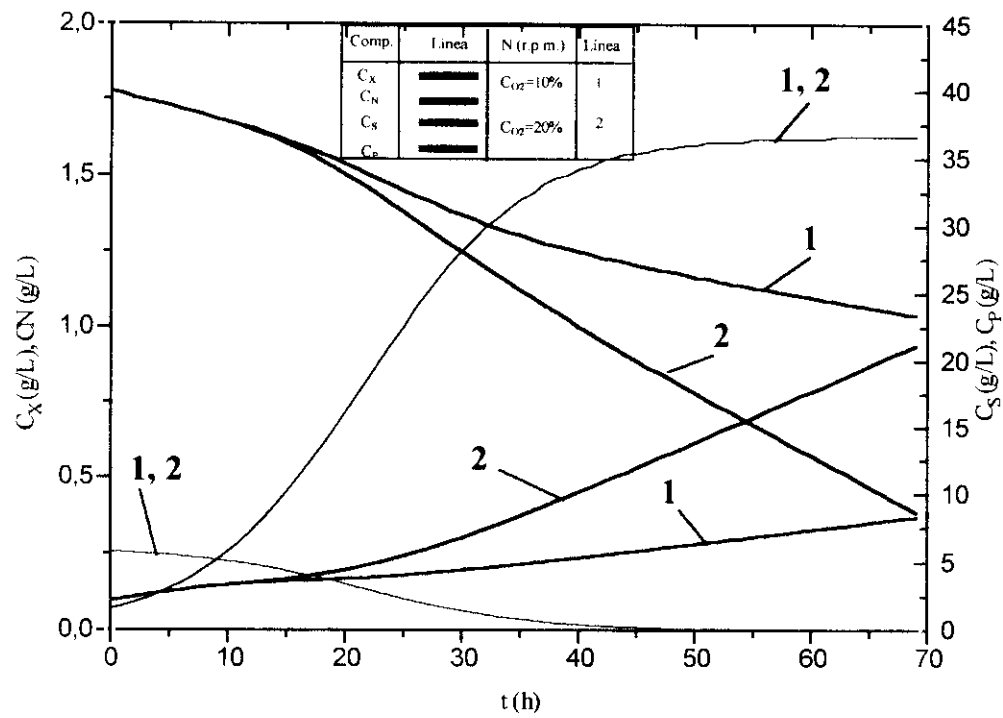


Figura 5.22- Simulación MCMST con diferentes concentraciones de oxígeno disuelto, influencia en la evolución de biomasa, xantano y sacarosa

5.3.3.- Validez del Modelo Metabólico

A lo largo de este apartado se han ido exponiendo los diferentes resultados obtenidos con el MCMT propuesto, tanto los obtenidos en ajustes a datos experimentales como en las distintas simulaciones realizadas.

Se han obtenido buenos resultados al aplicar el MCMT a los diferentes experimentos realizados en este trabajo, describiendo adecuadamente las evoluciones experimentales de xantano, sacarosa y oxígeno disuelto. Entre estos resultados no se han presentado los resultados correspondientes a la evolución de biomasa y concentración de amonio pues son los mismos que en el caso del modelo anterior MCNE.

Se ha conseguido plantear el modelo cinético metabólico en función a una de las dos variables estudiadas, concretamente, de la temperatura (T), de acuerdo a la tendencia que presentaban los parámetros obtenidos al realizar los ajustes de los experimentos realizados a diferentes temperaturas con el MCMTS. Se ha realizado la reproducción de los datos experimentales con el MCMTS (T), consiguiéndose un mejor resultado, en cuanto a la descripción de la evolución de los componentes, que los obtenidos por ajuste con el MCNE

No fue posible obtener una relación de los parámetros cinéticos calculados para experimentos realizados con distintas concentraciones de amonio, debido a que los parámetros obtenidos no presentaban una tendencia lógica respecto de la concentración inicial de dicho sustrato nitrogenado.

Las simulaciones, pues, fueron realizadas tomando los parámetros en función de la temperatura. Al comparar los resultados obtenidos de las diferentes simulaciones con los resultados experimentales, se ha podido llegar a las siguientes conclusiones, en cuanto a lo que el Modelo Cinético Metabólico es capaz de predecir:

- El modelo cinético metabólico es incapaz de predecir por medio de simulaciones la influencia de la concentración inicial de azúcar en la evolución de la biomasa. Tampoco predice ninguna influencia de este componente en la evolución de la concentración de xantano. Experimentalmente esto no es cierto, pues la concentración del sustrato carbonado tiene influencia en la concentración del polisacárido (Santos 1993).

- El modelo predice un máximo en la producción de xantano cuando se realizan simulaciones con diferentes concentraciones iniciales de biomasa (Figura 5.16), si bien esto último no fue observado experimentalmente (Santos, 1993).
- El MCMT es capaz de predecir la influencia del oxígeno en la velocidad de producción de xantano pero no en la evolución de la concentración de biomasa. Los resultados obtenidos en los ajustes a datos experimentales sobre la evolución de este componente han permitido observar la validez del MCMT para la reproducción de la concentración del oxígeno, mejorando significativamente los resultados de la evolución de oxígeno obtenidos por el MCNE.

Por todo esto, el Modelo Cinético Metabólico permite una buena reproducción de datos experimentales de la concentración de xantano, sacarosa y oxígeno disuelto. Este último componente no pudo ser reproducido de forma adecuada por el MCNE.

Por otro lado, en lo que respecta a la evolución de biomasa o parte de crecimiento del modelo, debería realizarse una mejora para poder explicar la influencia del oxígeno en el crecimiento, pues desde un punto de vista fisiológico no tiene sentido que una bacteria aerobia estricta, como *Xanthomonas campestris*, no se vea influida por la concentración de oxígeno disuelto en el medio. Se plantea ahora la necesidad de estructurar la biomasa para tratar, además, de predecir la influencia de la otra variable estudiada, -la concentración de amonio-, que influirá, como es lógico en la parte correspondiente al crecimiento del microorganismo.

Con el MCMT se ha estructurado el metabolismo de la fuente carbonada en la producción, es ahora necesario estructurar la biomasa teniendo en cuenta la fuente nitrogenada. En el próximo apartado se aplicará un modelo cinético más complejo, esto es un Modelo Cinético de Célula, el cual describirá el crecimiento de *Xanthomonas campestris* teniendo en cuenta el sustrato nitrogenado en la síntesis de componentes intracelulares, tales como proteínas y ácidos nucleicos, por lo que la biomasa aparecerá estructurada en varios componentes, lo cual complica el modelo de forma significativa.

6.- MODELO CINÉTICO **DE CÉLULA**

6.- MODELO CINÉTICO DE CÉLULA

La principal característica de los modelos cinéticos de célula es que describen la biomasa considerándola formada por varias especies, teniendo en cuenta los componentes intracelulares, como ácidos nucleicos, proteínas, lípidos e hidratos de carbono, proponiendo para su descripción un esquema de reacción simplificado.

Todos los modelos de este tipo existentes en la literatura explican sólo el crecimiento de microorganismos, y están desarrollados para aquellos muy conocidos como la bacteria *Escherichia coli* o la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Los modelos de célula se caracterizan por tener un elevado número de parámetros (entre 74 y 200), los cuales son obtenidos siempre de datos de la bibliografía. En ningún trabajo se presentan valores de los parámetros calculados mediante ajuste de datos experimentales. Esto es debido fundamentalmente a dos razones: una con relación al elevado número de parámetros que presentan los modelos cinéticos de célula, lo que implica una gran dificultad a la hora de abordar matemáticamente el problema; la otra, tiene relación con el análisis de los componentes clave del sistema. El seguimiento de componentes intracelulares presenta una especial dificultad para obtener datos fiables que puedan ser utilizados en el modelo cinético.

En este capítulo se propone un modelo de célula para el crecimiento de la bacteria *Xanthomonas campestris*, esto es, un modelo que tiene en cuenta la evolución de componentes intracelulares que forman parte de la biomasa del microorganismo. Se trata pues de un modelo de crecimiento que consta de un número de parámetros aproximadamente de 10, algo inferior a los planteados hasta ahora en la literatura (Esener y col., 1983) y que van a ser determinados por ajuste de datos experimentales.

En el modelo cinético de célula que se va a plantear, se estructura tanto el metabolismo del sustrato carbonado como el nitrogenado en el crecimiento del microorganismo. Se incluirá el metabolismo del sustrato nitrogenado en el interior de la célula, de una forma similar a Pons y col. (1989), que plantearon el correspondiente al sustrato carbonado en la producción de xantano. En la Figura 6.1 se muestra un esquema del metabolismo simplificado de la glucosa y el amonio, particularizando para esta bacteria, *Xanthomonas campestris* (Bradbury, 1984).

A la hora de plantear el modelo de célula para el crecimiento de *Xanthomonas campestris*, hay una serie de dificultades a considerar previamente.

- Como ya se ha comentado, para obtener datos experimentales que se puedan emplear en el modelo, es necesario disponer de **técnicas de análisis** fiables para el análisis de **componentes intracelulares**. Este es uno de los puntos críticos, sobre todo cuando el microorganismo a analizar tiene un tamaño pequeño como una bacteria (García-Ochoa y col., 1998). No resulta sencillo encontrar la técnica de análisis adecuada que permita obtener una buena resolución y fiabilidad de los datos de la evolución de componentes intracelulares. Como ya se describió en el Capítulo 2 de la presente Memoria, existen diferentes técnicas para cuantificar los componentes intracelulares, no obstante, no todas dan resultados reproducibles, lo que hace necesario realizar un especial esfuerzo en la puesta a punto de técnicas con tal fin. Como ya se indicó, la técnica de **Citometría de Flujo** fue elegida para el análisis de la evolución de los componentes intracelulares durante el crecimiento de *Xanthomonas campestris* en los experimentos llevados a cabo en este trabajo.

- Por otro lado, otro aspecto fundamental es el conocimiento detallado del **metabolismo del microorganismo** cuyo modelo de célula va a ser planteado. En el caso concreto del microorganismo empleado en este trabajo, existe suficiente información en la literatura sobre las rutas catabólicas y anabólicas empleadas por *Xanthomonas campestris* con diferentes sustratos carbonados y nitrogenados, lo cual facilita, desde este punto de vista, el planteamiento del modelo y permite así la simplificación del citado metabolismo mediante el denominado *lumping*, que consiste en la agrupación de moléculas con fórmulas moleculares medias que intervendrán, a su vez, en reacciones globales, llegándose a formular un **esquema simplificado de reacción**.

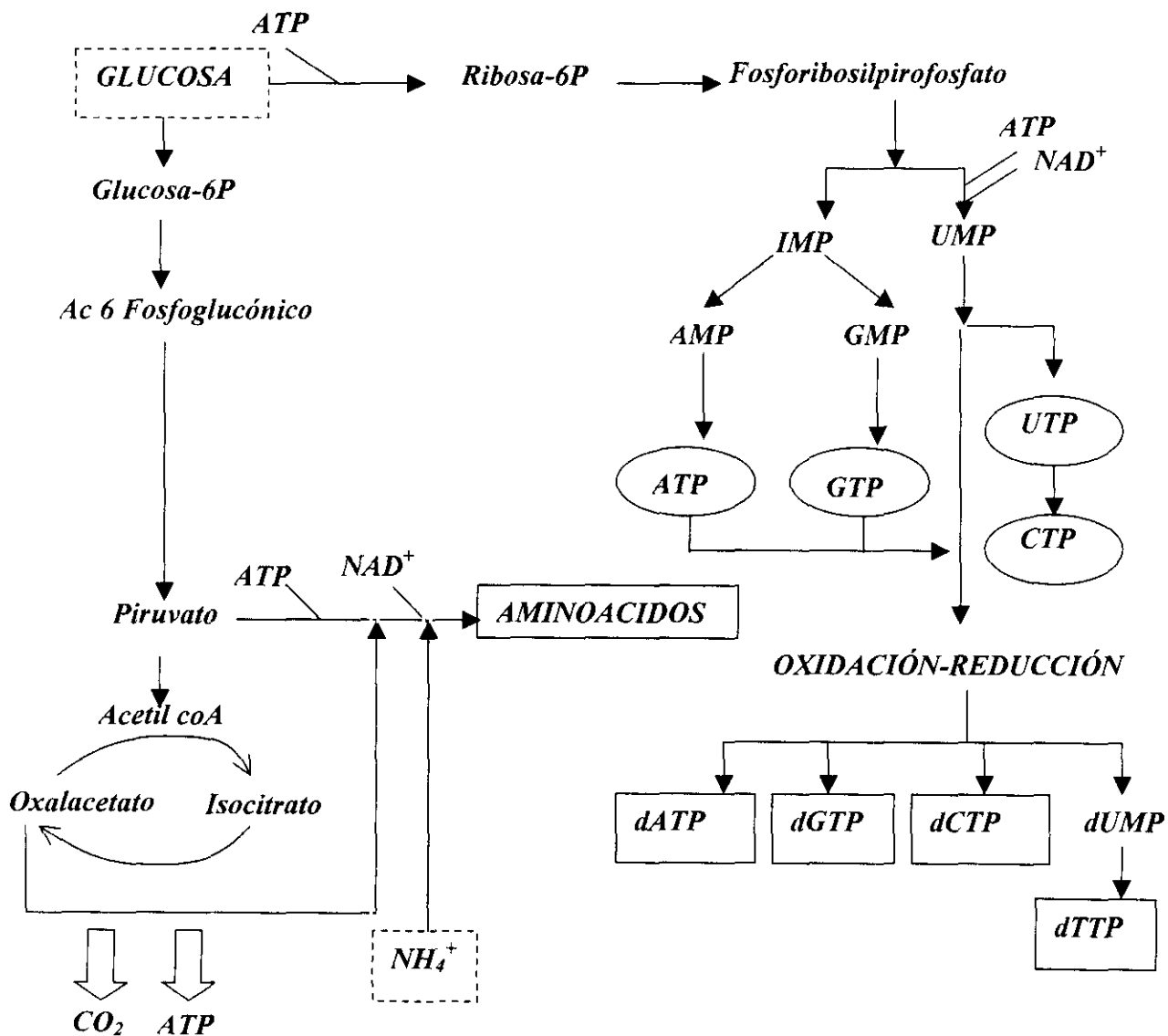


Figura 6.1.- Metabolismo simplificado de la glucosa y el amonio en el crecimiento de *Xanthomonas campestris*.

6.1.- ETAPAS EN EL PLANTEAMIENTO DEL MODELO

Ya se ha comentado la práctica inexistencia de precedentes en la literatura de este tipo de modelos, especialmente de un modelo de estas características para el sistema objeto de estudio. Por ello, se hace necesario desarrollar una metodología para abordar un problema tan complejo como es el plantear, aplicar y obtener parámetros por ajuste de datos experimentales del modelo cinético de célula para el crecimiento de un microorganismo, en este caso de la bacteria *Xanthomonas campestris*. Es un problema relativamente parecido al análisis de redes complejas de reacciones. El análisis cinético de dichos sistemas complejos es un problema complicado que precisa más información que en el caso de reacciones simples. La mayor complejidad viene dada por una estequiometría y una termodinámica más complejas y un número mayor de posibles modelos cinéticos -combinación de esquemas de reacción y ecuaciones cinéticas de cada reacción- entre los que hay que discriminar.

Se han intentado varios caminos para realizar este análisis cinético. Fundamentalmente dos (García-Ochoa y Romero, 1993):

- Estudiar una a una las reacciones del esquema, para reducir la complejidad del problema a una suma de reacciones simples, si bien no siempre es posible aplicar este procedimiento.
- Proponer un esquema, a menudo muy simplificado -molecular-, suponer unas ecuaciones cinéticas, calcular los parámetros y comparar con los datos experimentales obtenidos, cambiando cualquiera de las suposiciones hasta que la coincidencia sea aceptable.

Si la reacción es muy compleja (craqueo, oxidación de hidrocarburos, por ejemplo), la primera de las alternativas no es posible. La segunda de las opciones lleva a plantear esquemas moleculares, muy simplificados, empleando *lumping* de las especies químicas, y con ecuaciones cinéticas para las posibles reacciones, a ser posible, muy sencillas. Las ecuaciones cinéticas suelen ser modelos potenciales y en pocos casos hiperbólicos.

Tras el cálculo de los parámetros se puede proceder a la discriminación entre las distintos modelos cinéticos. Los criterios de discriminación utilizados normalmente han sido estadísticos y físicos o impuestos (García-Ochoa y col., 1989a y 1990a).

En consecuencia las etapas a seguir en la formulación del modelo cinético de célula son las siguientes:

- La primera etapa en la formulación del Modelo Cinético de Célula es la determinación o elección de las especies químicas que participan.
- Una vez conocidas las especies químicas, se debe plantear un **esquema simplificado de reacción**. Para llegar a él, se debe realizar un análisis exhaustivo de los datos experimentales. Además, se aplicará *lumping* de las especies químicas que forman este sistema, llegando, posteriormente, a la formulación de las ecuaciones de filiación (o relaciones estequiométricas definidas) de los diferentes compuestos que intervienen en las reacciones.
- A continuación, se debe plantear un **sistema de ecuaciones diferenciales**, que son las velocidades de producción de los compuestos clave, las únicas independientes entre sí. Los métodos aplicados para el cálculo de los parámetros del sistema citado se basan en una regresión de las ecuaciones a los datos experimentales.
- Una vez calculados los **parámetros**, es necesario comprobar la reproducibilidad del modelo. Para ello debe formularse el modelo cinético, mediante combinación de las ecuaciones cinéticas para determinar las velocidades de reacción. Si éste no es aceptable, es necesario recurrir a otro modelo, siendo primordial el establecimiento de criterios para realizar la **discriminación** en esta etapa (García-Ochoa y Romero, 1993).

- **Determinación de las Especies Químicas**

El estudio estequiométrico del sistema objeto de estudio puede ser de notable ayuda en los primeros pasos de la formulación de la red de reacción. La información que se debe obtener es:

- El número de componentes clave.
- El número de relaciones independientes entre las especies químicas que participan.
- Cómo pueden calcularse los cambios en la composición del sistema conociendo los cambios en la concentración de los componentes clave.

Esta información es muy importante para la determinación del método analítico capaz de seguir los cambios en la composición. Además, puede ser de gran utilidad para la propuesta del esquema de reacción debido a que el número mínimo de reacciones que deben incluirse en el esquema debe coincidir con el número de variables independientes y con el número de componentes clave. En este caso, en principio, se ha optado por asumir la biomasa por tres especies intracelulares: proteínas RNA y DNA. Esta hipótesis se contrastará más adelante.

• Esquema de Reacción Simplificado

La propuesta del esquema de reacción es un aspecto que no está totalmente sistematizado, cada autor trata de solventar su problema particularizando para su caso. El problema puede ser muy diferente dependiendo de la complejidad del sistema objeto de estudio, el cual cambia de acuerdo a diferentes aspectos:

- El primer paso en el planteamiento de cualquier modelo es la propuesta de un esquema de reacción simplificado. Para ello, ante la falta de antecedentes, parece necesario realizar un riguroso análisis de los datos experimentales, químicos o bioquímicos del sistema.
- El número de reacciones y de especies implicadas varían según los casos, desde cuatro a cinco especies hasta cientos de ellas, aunque como se verá más adelante es muy conveniente que coincidan el número de componentes clave y el de reacciones del esquema.
- En la mayoría de los casos, es casi imposible formular un esquema molecular simplificado debido a que el cálculo de cientos de parámetros por regresión de datos experimentales es prácticamente imposible. En los casos más complejos, hay también posibilidad de formular cientos de posibles modelos cinéticos, entre los que es necesario discriminar. La mayoría de los trabajos sobre casos prácticos de redes de reacciones tratan con esquemas simplificados, con no más de seis reacciones y, generalmente, el mismo número de componentes clave y de relaciones independientes.

En resumen, el esquema de reacción debe ser relativamente simple, pero capaz de describir la realidad del sistema, consiguiendo una descripción con un error del mismo orden de magnitud que el que se da en los datos experimentales.

En muchos de los casos, el único camino para simplificar el problema es empleando *lumping*, que permite reducir el número de componentes a considerar. El *lumping* asume que es posible agrupar componentes que participan en reacciones similares dentro del sistema. La aplicación rigurosa del *lumping* solo se ha estudiado en sistemas lineales muy sencillos, en los casos prácticos se ha aplicado de acuerdo al sentido común: por tamaño de las moléculas, por reactividad, etc. (García-Ochoa y col., 1989a).

• Propuesta de las Ecuaciones Cinéticas

Al analizar una red compleja de reacciones, como debe ser el esquema simplificado propuesto en el apartado anterior, las ecuaciones que ligán las magnitudes medibles (velocidades de producción o concentraciones) con las magnitudes que hay que determinar, en función de las condiciones de operación (velocidades de reacción), son (García-Ochoa y Romero, 1993):

$$R_j = \sum_{i=1}^{NR} \nu_{ij} \cdot r_{ij}; (j = 1 \dots NC) \quad [6.1]$$

De cuya integración, según el método propuesto por Himeelblau y col. (1967), se obtiene la ecuación:

$$C_j - C_{j0} = \sum_{i=1}^{NR} \nu_{ij} \int_0^t r_i \cdot dt; (j = 1 \dots NC) \quad [6.2]$$

Los **métodos diferenciales** están basados en la aplicación de la ecuación [6.1] a los NC componentes clave del sistema. Así, para el caso de cinéticas potenciales, la expresión dada por la ecuación [6.1] toma la forma:

$$R_j = \frac{dC_j}{dt} = \sum_{i=1}^{NR} \nu_{ij} \cdot k_i \cdot f_i(C_K); (C_j = 1 \dots NC) \quad [6.3]$$

El sistema de ecuaciones diferenciales que se obtiene se puede expresar en forma matricial como:

$$R = v \cdot r \quad [6.4]$$

La aplicación de este método lleva consigo las siguientes etapas:

- Cálculo de las velocidades de producción R_j , para los NC componentes clave. Este cálculo se realiza por ajuste de los datos experimentales a una función del tiempo conocida y posteriormente se deriva analíticamente, obteniéndose los valores discretos de las velocidades citadas si, como es habitual, se trata de datos integrales, composición vs tiempo.
- Cálculo de los parámetros cinéticos del sistema; para ello, se pueden realizar diferentes tipos de regresión lineal o no lineal y, además se puede realizar empleando simple o múltiple respuesta.

El **método integral** está basado en la aplicación de la ecuación [6.2] a los NC componentes clave del sistema. En el caso de una cinética potencial, dicha ecuación toma la forma:

$$C_j - C_{j0} = \sum_{i=1}^{NR} v_i \cdot k_i \int_0^t f(C_k) \cdot dt; (j = 1 \dots NC) \quad [6.5]$$

El sistema de ecuaciones integrales que se obtiene, se puede expresar matricialmente de la forma:

$$C = v \cdot r_s \quad [6.6]$$

donde r_s representa el producto de las integrales por las constantes de la ecuación [6.5].

Las etapas necesarias para la aplicación del método integral son:

- Cálculo de las integrales de las velocidades de reacción r_s , para las NR reacciones que tienen lugar. Este cálculo se puede realizar mediante el ajuste de los datos a una función conocida y posterior integración analítica, obteniéndose los valores discretos necesarios de dichas integrales.
- Cálculo de los parámetros cinéticos del modelo. Para ello, pueden ser aplicados tanto la regresión lineal como la no lineal, como en el caso anterior.

García-Ochoa y col. (1989b y 1990b) pusieron de manifiesto la clara ventaja que presentan los **métodos integrales** frente a los diferenciales, cuando se dispone, como en este caso, de datos de variación de la composición con el tiempo, debido, fundamentalmente, a la mayor precisión de los métodos numéricos de integración frente a los de derivación. Así mismo, propusieron el empleo de un conjunto de **ecuaciones en términos de velocidades de reacción**, en lugar de, lo habitualmente empleado, en términos de velocidades de producción de los componentes clave (García-Ochoa y Romero, 1993), de acuerdo a:

$$r = v^{-1} \cdot R \quad [6.7]$$

Aunque la ecuación anterior solo es aplicable cuando v es cuadrada, es decir, el número de componentes clave es igual al número de relaciones independientes, el método basado en las velocidades de reacción presenta ventajas, tanto desde un punto de vista de cálculo -una matemática mucho más sencilla, donde se individualiza el cálculo de cada parámetro-, como desde el punto de vista conceptual, de tratamiento, ya que, cuando el número de reacciones del esquema y el de componentes clave sea el mismo, al individualizar el cálculo de cada parámetro (k_i), se puede tratar un sistema complejo de reacciones como la suma de reacciones simples. Para aplicar este método en su variedad integral, hay que realizar la transformación de la ecuación [6.6] en la ecuación [6.8]:

$$r_s = v^{-1} \cdot C \quad [6.8]$$

La aplicación de esta ecuación a los NC componentes clave del modelo cinético conduce a grupos de ecuaciones independientes que permiten calcular los parámetros cinéticos del sistema por aplicación de una regresión lineal simple sin término independiente, de forma individual (en el caso de modelos potenciales). La ecuación [6.8] desarrollada, se puede escribir como:

$$k_i \cdot \int_0^t f(C_K) \cdot dt = \sum v_{ij} \cdot (C_j - C_{j0}); (i = 1 \dots NR) \quad [6.9]$$

• Formulación del Modelo Cinético

Una vez conocidas las cinéticas aplicando métodos como el de las velocidades de reacción, es necesario calcular los parámetros realizando un ajuste en múltiple respuesta, es decir no obteniendo los parámetros de las reacciones individuales, sino de forma conjunta mediante cálculo por regresión de los datos experimentales.

Una vez calculados los parámetros es necesario comprobar la reproducibilidad que el modelo cinético molecular proporciona de los resultados experimentales; si el ajuste no es aceptable, se debe recurrir a otro modelo.

Los modelos propuestos pueden obtenerse por combinaciones entre distintas cinéticas dentro del mismo esquema de reacción propuesto al formular el modelo. Muchas veces ocurre que varios modelos son capaces de describir el sistema, de forma que, en este punto, es primordial el establecimiento de criterios de discriminación.

• Criterios de Discriminación de Modelos

Como se ha indicado anteriormente, a veces se plantea la necesidad de discriminar entre un elevado número de modelos cinéticos, si bien muchos autores solo presentan los resultados obtenidos con un solo modelo, sin llegar a describir por qué lo han considerado el mejor frente a otros modelos, en principio, igualmente válidos.

Los criterios para la discriminación de modelos se agrupan básicamente en dos tipos (García-Ochoa y col., 1989 y 1990): criterios estadísticos y criterios físicos.

- **Los criterios estadísticos** están basados en la comparación de los valores de la F de Fischer y de la t de Student obtenidos del ajuste por regresión de los datos experimentales, siendo mejor aquel modelo que presente estos valores significativamente más altos. Así mismo, obtener intervalos de confianza muy estrechos indica un mejor ajuste del modelo a los datos experimentales, y por tanto un criterio de discriminación entre varios modelos. También pueden compararse los valores de la suma de residuos al cuadrado, considerando iguales aquellos que estén por debajo del error experimental.

- **Criterios Físicos** (o impuestos), el primero es el obtener valores positivos de los parámetros (k y $K > 0$) en todos los ajustes realizados con el modelo propuesto. El segundo criterio es la observación de una variación lógica de los parámetros obtenidos en los modelos propuestos con las variables que se estudian, por ejemplo temperatura o variación en la composición del medio, en el caso que se está analizando.

6.2.- MODELO CINÉTICO DE CRECIMIENTO DE *Xanthomonas campestris*

En este apartado se va a realizar la aplicación de todo lo comentado en el apartado anterior, es decir, se va a proceder a realizar el planteamiento de un modelo cinético de célula para el crecimiento de la bacteria *Xanthomonas campestris*. Para ello, se pondrá en práctica, paso a paso, la metodología comentada en el apartado anterior, en este caso para un sistema biológico complejo como es el crecimiento de la bacteria.

6.2.1.- Determinación de las Especies Químicas y Formulación del Esquema de Reacción

El primer paso en el planteamiento de cualquier modelo es la propuesta de un **esquema de reacción simplificado**. Para ello, ante la falta de antecedentes, parece necesario realizar un riguroso análisis de los datos experimentales, del crecimiento del microorganismo, obtenidos en este trabajo.

Se ha realizado un seguimiento de los **componentes intracelulares** de las células de *Xanthomonas campestris* a lo largo de todo el crecimiento del microorganismo. La técnica empleada ha sido la **citometría de flujo**. Con esta técnica se han obtenido resultados de concentración de ácidos nucleicos (DNA y RNA), así como de proteína intracelular (tanto proteínas estructurales, como enzimas) por célula. Como ya fue comentado en el Capítulo 2 de la presente Memoria, los datos de intensidad media de fluorescencia de cada componente por individuo, pueden ser convertidos en cantidad (g) de componente por individuo, gracias al calibrado obtenido, como indica la Figura 6.2. Los datos de contenido en g/célula, pueden ser puestos en unidades de g/L (gramo de componente por litro de caldo), gracias a la aplicación de la ecuaciones [2.11] para proteínas y [2.14] para ácidos nucleicos (DNA y RNA).

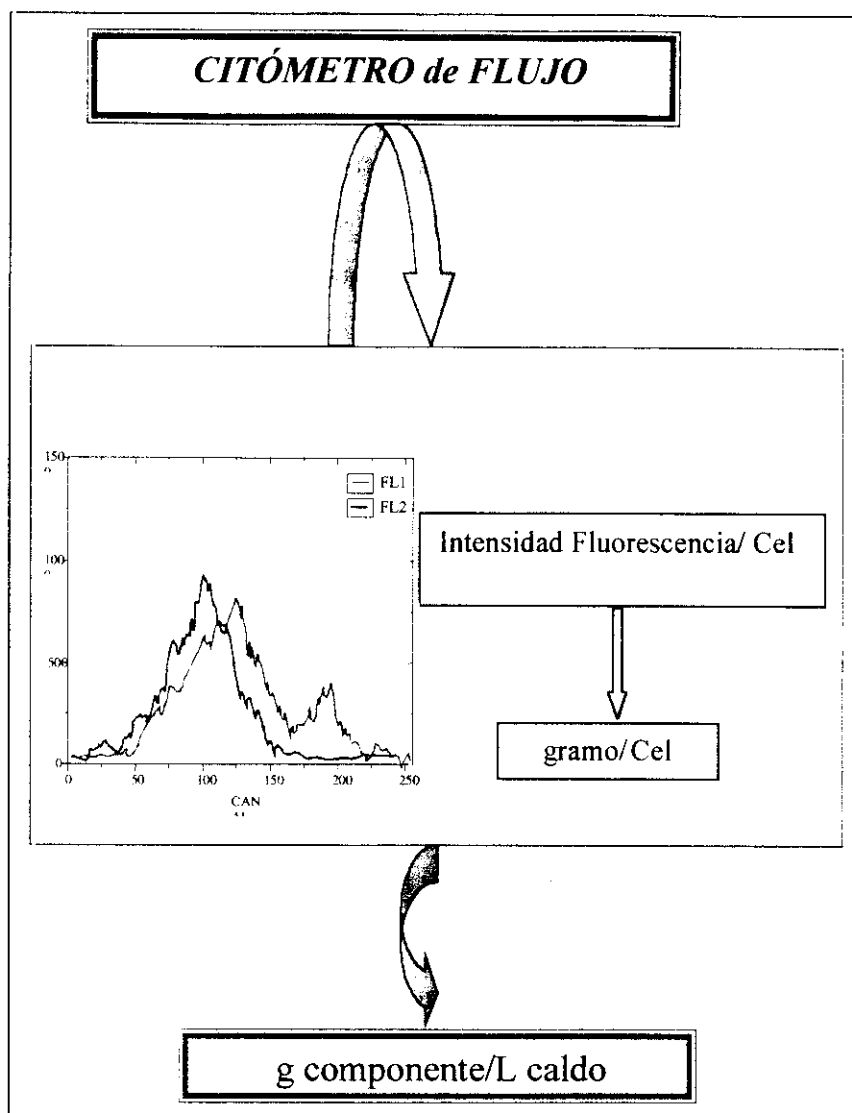


Figura 6.2.- Unidades de los datos obtenidos a partir del Citómetro de Flujo y su conversión en otras para aplicar en el modelo cinético

Además del seguimiento de los componentes intracelulares, se ha analizado otro compuesto clave, en este caso extracelular, importante en el crecimiento del microorganismo, esto es, la evolución de la concentración de amonio en el caldo. El metabolismo de este sustrato nitrogenado es importante por ser el sustrato limitante del crecimiento en el proceso, y porque, una vez consumido, estará formando parte de ácidos nucleicos (DNA y RNA) y de proteínas, principalmente. Por todo ello, un balance de materia para el sustrato nitrogenado es, sin duda, de ayuda para hacer la primera aproximación al esquema de reacción del modelo cinético de célula.

Como ya se ha indicado, el nitrógeno (en forma de amonio) que será consumido por el microorganismo, irá a formar los componentes intracelulares, pero además parte de éste nitrógeno puede ser empleado para sintetizar otras proteínas que no quedarán en el interior

celular sino que serán excretadas al caldo. Estas proteínas (proteínas extracelulares) no han sido analizadas, pero su evolución puede ser obtenida realizando el balance de nitrógeno antes comentado.

Para realizar dicho balance de nitrógeno, hay que calcular previamente la concentración de nitrógeno que hay en la molécula de **amonio** (que es como se incorpora en el medio de cultivo); se empleó la siguiente ecuación:

$$C_{N_A}(g/L) = C_A(g/L) \cdot \frac{14}{18} \quad [6.10]$$

Para el cálculo de la concentración de nitrógeno que hay en las **moléculas medias de los componentes intracelulares** (deducidas por aplicación del *lumping*) se emplean las siguientes ecuaciones:

La relación entre la concentración de nitrógeno y la concentración de **RNA** se calcula por ($C_{9,5}H_{11,75}O_{13,75}N_{3,75}P_3$):

$$C_{N_{RNA}}(g/L) = C_{RNA}(g/L) \cdot \frac{3,75 \cdot 14}{491,16} \quad [6.11]$$

La relación entre la concentración de nitrógeno y la concentración de **DNA** ($C_{9,5}H_{12}O_{13,75}N_{3,75}P_3$), es:

$$C_{N_{DNA}}(g/L) = C_{DNA}(g/L) \cdot \frac{3,75 \cdot 14}{486,41} \quad [6.12]$$

Para proteínas, se consideró la fórmula media: $C_{5,34}H_{9,64}O_{2,37}N_{1,36}S_{0,099}$, con lo que la concentración de nitrógeno a partir de la concentración de proteína, se ajusta a la siguiente relación:

$$C_{N_{PR}}(g/L) = C_{PR}(g/L) \cdot \frac{1,36 \cdot 14}{133,848} \quad [6.13]$$

En las Tablas 6.1 a 6.7 se muestran las concentraciones de nitrógeno empleadas por el microorganismo en la síntesis de los componentes intracelulares en los distintos experimentos realizados en este trabajo. En las citadas tablas se muestran las evoluciones de nitrógeno (por molécula de amonio) C_{N_A} , así como las cantidades de nitrógeno en **DNA** ($C_{N_{DNA}}$), **RNA** ($C_{N_{RNA}}$) y **proteínas intracelulares** ($C_{N_{PR}}$). Además, se ha realizado la suma de estos tres componentes ($C_{N,T}$), con el fin de compararlo con la concentración inicial

añadida y la que todavía no ha sido consumida (en caso de que todavía quede). De esta manera, se puede calcular la cantidad de nitrógeno que emplea la bacteria, en cada caso, para la síntesis de **proteína extracelular**, cuyo análisis no fue realizado, pero que puede deducirse de acuerdo a la ecuación [6.14], asumiendo que la cantidad de amonio consumido, no inmovilizado como componente, va a parar a proteínas extracelulares:

$$C_{NPRE} = C_{NA0} - C_{NT} - C_{NA} \quad [6.14]$$

En la Tabla 6.1 se muestran los resultados del experimento realizado con **65 p.p.m.** de amonio inicial (experimento n°5). Si comparamos la cantidad de nitrógeno total con la añadida inicialmente en el medio de cultivo (0,0506 g/L de nitrógeno), se observa que la cantidad de nitrógeno encontrada como suma de DNA, RNA y proteínas intracelulares es **mayor** que la cantidad inicial de nitrógeno, llegándose a obtener 0,083 g/L de nitrógeno “inmovilizado” en componentes intracelulares. Este balance podría indicar que el microorganismo puede sintetizar estos componentes empleando otra fuente de nitrógeno, por ejemplo aminoácidos procedentes del medio YM, que es el medio empleado para realizar el inóculo en el biorreactor. O bien, podría ser que el microorganismo estuviera empleando este amonio en “fabricar” componentes con una composición diferente a la que tiene cuando la concentración de amonio es mayor, o lo que es lo mismo, con una estequiometría diferente. Además, se observa en la tabla que no hay síntesis de proteína extracelular, salvo la que aparece entre las 3 a 16 horas de la fermentación, pero en la fase estacionaria de crecimiento no parece que exista excreción de este tipo de proteínas.

Para el experimento realizado con **130 p.p.m.** (experimento n° 6), que aparece en la Tabla 6.2, el balance del nitrógeno indica que el nitrógeno inicial añadido 0,1011 g/L se encuentra en los componentes intracelulares hasta una cantidad máxima 0,084 g/L (observada en la fase estacionaria de crecimiento), teniendo en cuenta que se ha consumido completamente el nitrógeno a lo largo de la fermentación, el nitrógeno que “falta” estará formando parte de la proteína extracelular, como refleja la última columna de la citada tabla.

En la Tabla 6.3 se muestra el balance de nitrógeno realizado para el experimento con la concentración de **257 p.p.m.** de amonio inicial y una temperatura de **28°C** (experimento n° 2). En él, la cantidad inicial de nitrógeno añadida en forma de amonio es de 0,24 g/L, mientras que la obtenida como biomasa (suma de componentes intracelulares) es de 0,183

g/L, considerando que también ha habido un consumo total de nitrógeno, la última columna indica la cantidad de nitrógeno que formará parte de proteína extracelular.

Para el experimento realizado con **475 p.p.m.** y **28° C** (experimento n° 7), que aparece en la Tabla 6.4, la cantidad de nitrógeno inicial es muy elevada (0,369 g/L), no obstante sólo aparece en forma de componente intracelular la cantidad de 0,1147 g/L. El microorganismo, en este caso, no consume todo este nitrógeno, quedando una cantidad residual al final de la fermentación de 0,062 g/L. Al realizar el balance de la misma forma que en experimentos anteriores, se obtiene cierta cantidad de nitrógeno en forma de proteína extracelular, como indica la última columna de la tabla. El hecho de que en este experimento no haya consumo total de amonio indica que en este caso el sustrato nitrogenado no está siendo el nutriente limitante del crecimiento, como ocurre en los demás.

En la Tabla 6.5 aparecen los resultados obtenidos para el experimento realizado a **25°C** y **257 p.p.m.** (experimento n°1), al igual que en otros, el balance de nitrógeno indica que parte es empleado para la síntesis de componentes intracelulares, (0,16 g/L) y otra para la síntesis de proteína extracelular, pues todo el nitrógeno añadido inicialmente (0,151 g/L) se consume completamente durante la fermentación.

En la Tabla 6.6, se presenta el balance de nitrógeno para el experimento n° 3, es decir, el realizado a **31°C** y **257 p.p.m.**, con una concentración inicial de nitrógeno de 0,17 g/L, la cual es consumida prácticamente, encontrándose casi todo el nitrógeno inmovilizado en los componentes de la biomasa 0,12 g/L (nitrógeno total) en la fase estacionaria de crecimiento, y en un porcentaje menor como proteína extracelular (0,014 g/L).

Por último, en la Tabla 6.7 aparece el balance para el experimento realizado a **34°C** y con una concentración de amonio inicial de **257 p.p.m** (experimento n° 4). En este caso, no llega a consumirse todo el nitrógeno añadido inicialmente (0,157 g/L) pues queda una cantidad residual de 0,077 g/L. En este experimento, todo el nitrógeno consumido se encuentra inmovilizado como componentes intracelulares, y un porcentaje de nitrógeno se empleará para la síntesis de proteínas extracelulares en la fase estacionaria de crecimiento, como indica la última columna de la Tabla 6.7.

Tabla 6.1.- Cálculo del nitrógeno aprovechado por *Xanthomonas campestris* durante la fermentación en el experimento n° 5, llevado a cabo con 65 p.p.m. de amonio y 28°C.

Tiempo (h)	C _{N,A} (g/L)	C _{RNA} (g/L)	C _{DNA} (g/L)	C _{PRI} (g/L)	ΣC _{DNA, RNA, PRI} (g/L)	C _{PRE} (g/L)
0	0.0505	0.00016	0.00023	0.00062	0.0010	0
1.5	0.0497	0.00017	0.00025	0.00068	0.0011	0
3	0.0482	0.00018	0.00026	0.00071	0.0011	0.0011
4.5	0.0466	0.00021	0.0003	0.0008	0.0013	0.0025
6	0.0451	0.00027	0.00038	0.0010	0.0016	0.0037
8.5	0.0435	0.00063	0.00089	0.0023	0.0039	0.0030
12	0.0326	0.001	0.0014	0.0037	0.0061	0.0117
16	0.0256	0.0024	0.0033	0.0090	0.0148	0.0100
20	0.0194	0.0055	0.0078	0.0210	0.0344	0
23.5	0.0132	0.0123	0.0172	0.0463	0.0759	0
24.5	0.0093	0.0127	0.0178	0.0478	0.0783	0
25.25	0.0062	0.0130	0.0183	0.0492	0.0806	0
26	0.0015	0.0132	0.0186	0.0499	0.0818	0
27.5	0.00078	0.0134	0.0188	0.0506	0.0830	0
31	0.00078	0.0134	0.0188	0.0506	0.0830	0
32	0.00078	0.0134	0.0188	0.0506	0.0830	0
32.5	0.00078	0.0134	0.0188	0.0506	0.0830	0
33	0.00078	0.0134	0.0188	0.0506	0.0830	0
35	0.00078	0.0134	0.0188	0.0506	0.0830	0
40	0.00078	0.0134	0.0188	0.0506	0.0830	0

Tabla 6.2.- Cálculo del nitrógeno aprovechado por *Xanthomonas campestris* durante la fermentación en el experimento n° 6, llevados a cabo con 130 p.p.m. de amonio y 28°C.

Tiempo (h)	C _{N,A} (g/L)	C _{RNA} (g/L)	C _{DNA} (g/L)	C _{PRI} (g/L)	ΣC _{DNA, RNA, PRI} (g/L)	C _{PRE} (g/L)
0	0.1011	0.00021	0.0003	0.0008	0.00131	0
2.5	0.1008	0.00025	0.00035	0.00094	0.00154	0
3.5	0.0972	0.00031	0.00043	0.00116	0.0019	0.00188
5.5	0.0855	0.00035	0.00049	0.0013	0.00214	0.01331
7	0.0746	0.00040	0.00057	0.00152	0.00249	0.02384
8	0.0661	0.00048	0.00067	0.00181	0.00297	0.03192
9.25	0.0591	0.00092	0.0013	0.00348	0.0057	0.03619
10.5	0.0528	0.00112	0.00157	0.00421	0.0069	0.04121
16	0.0248	0.0019	0.00267	0.00717	0.01175	0.06437
20	0.0194	0.0042	0.00592	0.01588	0.02602	0.05554
24.25	0.0085	0.0051	0.00729	0.01955	0.03203	0.06041
25	0.0073	0.0063	0.0089	0.0239	0.03915	0.05446
26.5	0.0058	0.0080	0.01133	0.03041	0.04982	0.04535
28.5	0.0048	0.0092	0.01299	0.03487	0.05713	0.03905
30.5	0.0031	0.0121	0.017	0.04562	0.07474	0.02314
31.5	0.0019	0.0128	0.01808	0.04852	0.07949	0.01957
32	0.00078	0.0132	0.01862	0.04997	0.08186	0.01836
33.5	0.00075	0.0138	0.01943	0.05214	0.08542	0.01483
38	0.00066	0.0138	0.01943	0.05214	0.08542	0.01492
47	0.00008	0.0140	0.0197	0.05287	0.08661	0.01431
47.5	0.00008	0.0140	0.0197	0.05287	0.08661	0.01431
49	0.00008	0.0140	0.0197	0.05287	0.08661	0.01431
50	0.00008	0.0140	0.0197	0.05287	0.08661	0.01431
51	0.00008	0.0140	0.0197	0.05287	0.08661	0.01431
53.5	0.00008	0.0140	0.0197	0.05287	0.08661	0.01431

Tabla 6.3.- Cálculo del nitrógeno aprovechado por *Xanthomonas campestris* durante la fermentación en el experimento n° 2, llevados a cabo con 257 p.p.m. de amonio.y 28° C

Tiempo (h)	C _{N.A} (g/L)	C _{RNA} (g/L)	C _{DNA} (g/L)	C _{PRI} (g/L)	ΣC _{DNA, RNA, PRI} (g/L)	C _{PRE} (g/L)
0	0.2403	0.0013	0.0018	0.0048	0.0081	0
2	0.2333	0.0016	0.0022	0.0058	0.0097	0
4	0.2317	0.0019	0.0026	0.0068	0.0114	0
7	0.2232	0.0025	0.0035	0.0090	0.0150	0.0037
9	0.2177	0.0030	0.0042	0.0108	0.0180	0.0061
12	0.2138	0.0040	0.0056	0.0145	0.0242	0.0039
13	0.2092	0.0044	0.0061	0.0159	0.0265	0.0062
14.5	0.2068	0.0055	0.0077	0.0200	0.0333	0.0017
16	0.1975	0.0057	0.0081	0.0208	0.0347	0.0096
16.5	0.1921	0.0067	0.0094	0.0243	0.0405	0.0093
19.5	0.1711	0.0092	0.0129	0.0334	0.0556	0.0152
23.5	0.1477	0.0119	0.0167	0.0431	0.0718	0.0223
24	0.1291	0.0127	0.0178	0.0461	0.0768	0.0360
24.5	0.1088	0.0152	0.0213	0.0550	0.0915	0.0415
28	0.0777	0.0175	0.0245	0.0633	0.1054	0.0587
32	0.0637	0.0234	0.0329	0.0849	0.1413	0.0368
33.5	0.0567	0.0240	0.0337	0.0871	0.1450	0.0401
34	0.0427	0.0259	0.0364	0.0940	0.1564	0.0428
38	0.0350	0.0269	0.0377	0.0974	0.1622	0.0448
38.5	0.0194	0.0279	0.0391	0.1009	0.1679	0.0545
39.5	0.0101	0.0288	0.0404	0.1044	0.1737	0.0581
41.5	0.00078	0.0297	0.0417	0.1077	0.1793	0.0618
42	0.00063	0.03001	0.0420	0.1086	0.1807	0.0606
43.7	0.00040	0.0304	0.0426	0.1100	0.1830	0.0585
48	0.00008	0.0304	0.0426	0.1100	0.1830	0.0588
48.5	0.00008	0.0304	0.0426	0.1100	0.1830	0.0588
52	0.00008	0.0304	0.0426	0.1100	0.1830	0.0588

Tabla 6.4.- Cálculo del nitrógeno aprovechado por *Xanthomonas campestris* durante la fermentación en el experimento n° 7, llevados a cabo con 475 p.p.m. de amonio y 28°C.

Tiempo (h)	C _{N,A} (g/L)	C _{RNA} (g/L)	C _{DNA} (g/L)	C _{PRI} (g/L)	ΣC _{DNA, RNA, PRI} (g/L)	C _{PRE} (g/L)
0	0.3694	0.0001	0.00016	0.00041	0.00068	0
2	0.3686	0.0001	0.00026	0.00067	0.0011	0
4	0.3678	0.00022	0.00032	0.00084	0.0014	0
7	0.3655	0.00043	0.00059	0.0015	0.0025	0.0009
9	0.3616	0.00050	0.0007	0.0018	0.0030	0.0043
12	0.3562	0.00067	0.00094	0.0024	0.0040	0.0087
13	0.3538	0.00089	0.0012	0.0032	0.0053	0.0097
14.5	0.3422	0.0011	0.0016	0.0041	0.0069	0.0198
16	0.3111	0.0016	0.0022	0.0059	0.0098	0.0480
16.5	0.2761	0.0017	0.0024	0.0062	0.0104	0.0824
19.5	0.1944	0.0024	0.0034	0.0089	0.0149	0.1596
23.5	0.1400	0.0061	0.0086	0.0222	0.0370	0.1919
24	0.1166	0.0090	0.0126	0.0327	0.0544	0.1978
24.5	0.0933	0.0117	0.0164	0.0423	0.0704	0.2052
28	0.0855	0.0157	0.0221	0.0571	0.0950	0.1884
32	0.0661	0.0177	0.0248	0.0640	0.1065	0.1963
33.5	0.0622	0.0190	0.0267	0.0689	0.1147	0.1920
34	0.0622	0.0190	0.0267	0.0689	0.1147	0.1920
38	0.0622	0.0190	0.0267	0.0689	0.1147	0.1920
38.5	0.0622	0.0190	0.0267	0.0689	0.1147	0.1920
39.5	0.0622	0.0190	0.0267	0.0689	0.1147	0.1920

Tabla 6.5.- Cálculo del nitrógeno aprovechado por *Xanthomonas campestris* durante la fermentación en el experimento n° 1, llevados a cabo con 257 p.p.m. de amonio y 25° C.

Tiempo (h)	C _{N,A} (g/L)	C _{RNA} (g/L)	C _{DNA} (g/L)	C _{PRI} (g/L)	ΣC _{DNA, RNA, PRI} (g/L)	C _{PRE} (g/L)
0	0	0.0017	0.0021	0.0051	0.0087	0.0012
5.7	0.3012	0.0061	0.0031	0.0085	0.0176	0.0024
7.7	0.2951	0.0069	0.0101	0.0211	0.0369	0.0034
9	0.2922	0.0111	0.0161	0.0321	0.0582	0.0043
10	0.2812	0.0123	0.0171	0.0351	0.0642	0.0053
12	0.2761	0.0182	0.0261	0.0473	0.0911	0.0079
16	0.2741	0.0591	0.0872	0.1522	0.2961	0.0168
17	0.1813	0.0641	0.1093	0.1831	0.3562	0.0203
20	0.1241	0.1082	0.1325	0.2811	0.5183	0.0346
24	0.0901	0.1323	0.1922	0.3503	0.6744	0.0679
25	0.0851	0.1522	0.2522	0.3802	0.7855	0.0802
28	0.0752	0.1711	0.2712	0.4411	0.8821	0.1271
29	0.0414	0.1802	0.2811	0.4702	0.9332	0.1438
32	0.0333	0.2301	0.3511	0.6502	1.2321	0.1764
34	0.0112	0.2606	0.3824	0.7025	1.3422	0.1784
35	0.0091	0.2707	0.4225	0.7201	1.3933	0.1785
38	0.0006	0.2805	0.4122	0.7811	1.4733	0.1785
50	0.0006	0.3002	0.4300	0.7811	1.5121	0.1785

Tabla 6.6.- Cálculo del nitrógeno aprovechado por *Xanthomonas campestris* durante la fermentación en el experimento n° 2, realizado con 257 p.p.m. de amonio y 31° C.

Tiempo (h)	C _{NA} (g/L)	C _{RNA} (g/L)	C _{DNA} (g/L)	C _{PRI} (g/L)	ΣC _{DNA, RNA, PRI} (g/L)	C _{PRE} (g/L)
0	0.1711	0.0025	0.0035	0.0095	0.0156	0
0.5	0.1697	0.0028	0.00405	0.0108	0.0178	0
1.15	0.1677	0.0030	0.00426	0.0114	0.0187	0
3	0.1655	0.0032	0.00456	0.0122	0.0200	0
3.5	0.1595	0.0033	0.00467	0.0125	0.0205	0
6	0.1512	0.0038	0.00537	0.0144	0.0236	0
8	0.1445	0.0044	0.00621	0.0166	0.0272	0.0074
8.5	0.1329	0.0048	0.00677	0.0181	0.0297	0.0082
9	0.1299	0.0058	0.0082	0.0220	0.0360	0.0054
10	0.1221	0.0074	0.0103	0.0278	0.0456	0.0031
12	0.1061	0.0080	0.0113	0.0304	0.0498	0.0150
14.5	0.0846	0.0105	0.0148	0.0398	0.0652	0.0211
15	0.0803	0.0113	0.0159	0.0427	0.0711	0.0207
16	0.0718	0.0115	0.0161	0.0434	0.0711	0.0279
18.5	0.0524	0.0130	0.0183	0.0492	0.0806	0.0379
20	0.0423	0.0134	0.0188	0.0506	0.0830	0.0456
23.5	0.0243	0.0171	0.0240	0.0644	0.1055	0.0410
24	0.0224	0.0173	0.0242	0.0651	0.1067	0.0418
24.5	0.0206	0.0182	0.0256	0.0688	0.1127	0.0376
25	0.0189	0.0189	0.0265	0.0713	0.1168	0.0352
26.5	0.0145	0.0190	0.0267	0.0716	0.1174	0.0389
27	0.0133	0.0197	0.0276	0.0743	0.1217	0.0359
28	0.0111	0.0197	0.0276	0.0743	0.1217	0.0381
30	0.0077	0.0206	0.0289	0.0777	0.1273	0.0359
31.7	0.0056	0.0203	0.0285	0.0766	0.1255	0.0398
35	0.0030	0.0203	0.0285	0.0766	0.1255	0.0424

Tabla 6.7.- Cálculo del nitrógeno aprovechado por *Xanthomonas campestris* durante la fermentación en el experimento n° 4, llevados a cabo con 257 p.p.m. de amonio y 34° C.

Tiempo (h)	C _{N,A} (g/L)	C _{RNA} (g/L)	C _{DNA} (g/L)	C _{PRI} (g/L)	$\Sigma C_{DNA,RNA,PRI}$ (g/L)	C _{PRE} (g/L)
0	0.1571	0.00019	0.00027	0.0007	0.0011	0
3	0.1547	0.00029	0.0004	0.0010	0.0017	0.0011
6	0.1462	0.00048	0.00067	0.0017	0.0029	0.0013
9	0.1361	0.00077	0.0010	0.0028	0.0046	0.0012
12	0.1151	0.0011	0.0014	0.0036	0.0060	0.0015
14	0.1143	0.0013	0.0018	0.0047	0.0078	0.0017
14.5	0.1104	0.0014	0.0019	0.0050	0.0083	0.0022
18	0.1088	0.0023	0.0032	0.0083	0.0139	0.0081
20	0.1052	0.0048	0.0067	0.0174	0.0289	0.0075
24	0.1011	0.0067	0.0094	0.0243	0.0405	0.0101
24.5	0.0972	0.0086	0.0121	0.0313	0.0521	0.0110
30	0.0933	0.0134	0.0188	0.0487	0.0811	0.0121
33	0.0855	0.0150	0.0210	0.0543	0.0903	0.0152
36	0.0855	0.0173	0.0243	0.0627	0.1043	0.0223
36.5	0.0777	0.0188	0.0264	0.0682	0.1135	0.0251
40	0.0777	0.0269	0.0377	0.0975	0.1622	0.0252
42	0.0777	0.0269	0.0377	0.0975	0.1622	0.0252
45	0.0777	0.0269	0.0377	0.0975	0.1622	0.0252
48	0.0777	0.0269	0.0377	0.0975	0.1622	0.0252

Todos estos resultados sugieren que el nitrógeno consumido por el microorganismo va a formar parte fundamentalmente de la biomasa (DNA, RNA y proteína intracelular), y sólo un pequeño porcentaje va a constituir las proteínas extracelulares. Una excepción la presenta el experimento realizado a 65 p.p.m., donde no ha sido posible cerrar el balance de nitrógeno, probablemente debido a que la estequiometría asumida no es válida con concentraciones tan bajas de nitrógeno, aspecto que será comentado más adelante. Una vez realizado el balance de nitrógeno anterior, se observó la evolución de los componentes intracelulares implicados directamente en el crecimiento del microorganismo, pues el conocimiento de su evolución con el tiempo va a facilitar los primeros pasos en el planteamiento del modelo. En las Figuras 6.3 a 6.9 se muestran las evoluciones de los componentes intracelulares (DNA, RNA y proteínas), así como la suma de estos tres componentes estructurales de la célula, con el fin de comparar con la biomasa experimental. Así mismo aparece en dichas figuras el consumo de amonio, además aparece la evolución de la proteína extracelular calculada de la forma indicada anteriormente.

Se puede observar que las evoluciones de todos los componentes (en g/L) en todos los experimentos es similar. El contenido en proteínas es siempre mayor que el contenido en ácidos nucleicos y, dentro de éstos, la cantidad de DNA es siempre mayor que la de RNA. Por otro lado, se observa la estrecha relación entre la síntesis de estos componentes y el consumo de nitrógeno, es decir, cuando el sustrato nitrogenado se agota, el microorganismo no puede seguir sintetizando nuevas moléculas, por lo que la síntesis de aminoácidos se detiene y, en consecuencia, la síntesis de ácidos nucleicos, lo que provoca que el microorganismo entre en la fase estacionaria del crecimiento. Una excepción a esta afirmación es la correspondiente al experimento realizado con una concentración de amonio inicial de 0,475 g/L; en este caso, cuando el microorganismo entra en la fase estacionaria del crecimiento, todavía queda una concentración elevada del sustrato nitrogenado en el medio, por lo que la entrada en esta fase se debe, probablemente, a otro nutriente que se ha agotado y no al nitrógeno. Además, en todas las gráficas se ha representado la suma de los componentes intracelulares (DNA, RNA y proteínas), que se ha llamado biomasa teórica ($C_{XT\text{teor}}$), se aprecia que esta suma en todos los casos es semejante al valor de la biomasa obtenida experimentalmente, existiendo una diferencia -no muy significativa- en la fase estacionaria del crecimiento, debido a que no se han considerado otros componentes, como lípidos o hidratos de carbono, que, aunque en mucha menor cantidad, se encuentran en la biomasa, y pueden ser los responsables de esa pequeña diferencia entre la biomasa experimental y la teórica (DNA, RNA y proteínas intracelulares).

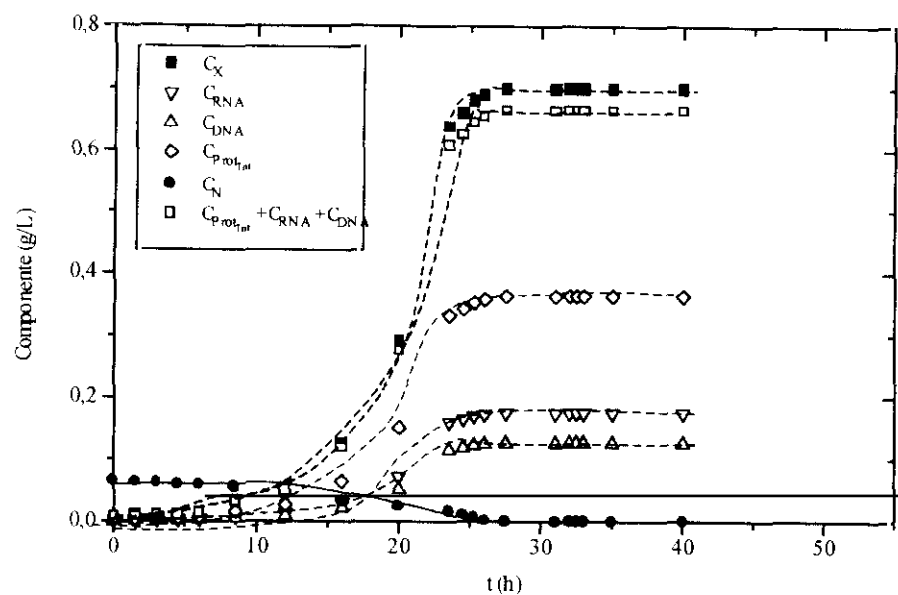


Figura 6.3.- Evolución de componentes intracelulares, fuente de nitrógeno y biomasa del experimento n° 5 . Condiciones experimentales: C_{N0} =65 p.p.m., $T= 28\text{ }^{\circ}\text{C}$, N =variable (210 r.p.m. inicial).

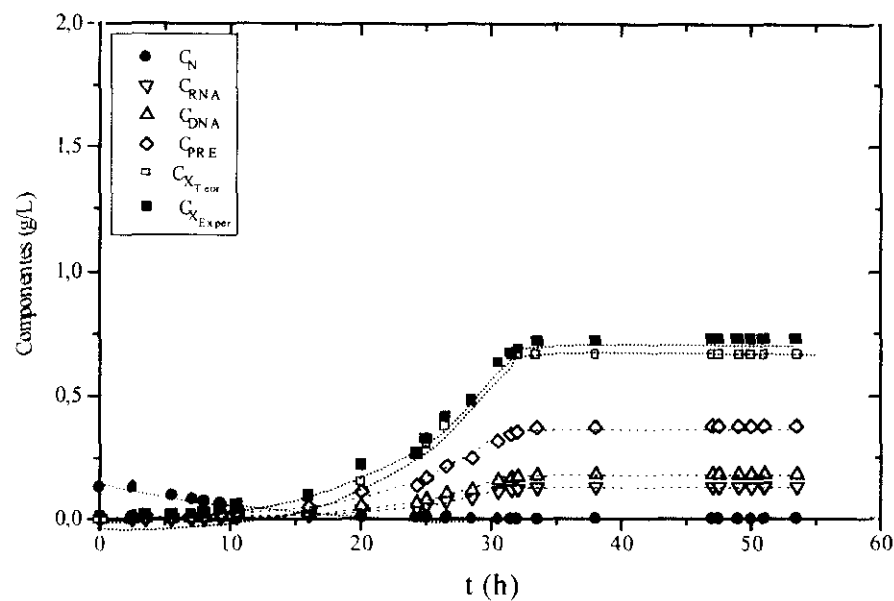


Figura 6.4.- Evolución de componentes intracelulares, fuente de nitrógeno y biomasa del experimento n° 6. Condiciones experimentales: C_{N0} =130 p.p.m., $T= 28\text{ }^{\circ}\text{C}$, N =variable (210 r.p.m. inicial)

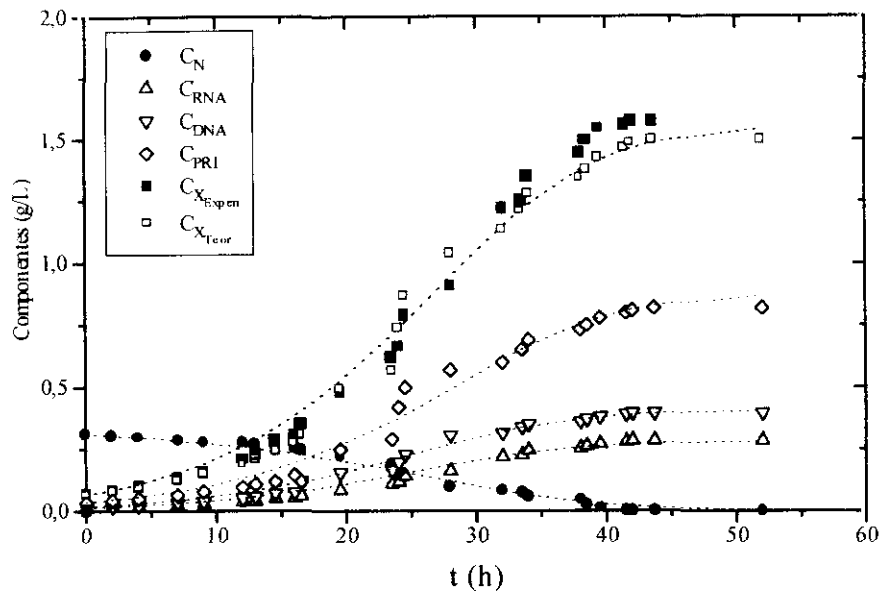


Figura 6.5.- Evolución de componentes intracelulares, fuente de nitrógeno y biomasa del experimento n° 2 . Condiciones experimentales: $C_{N0}=257$ p.p.m., $T=28$ °C, $N=$ variable (210 r.p.m. inicial)

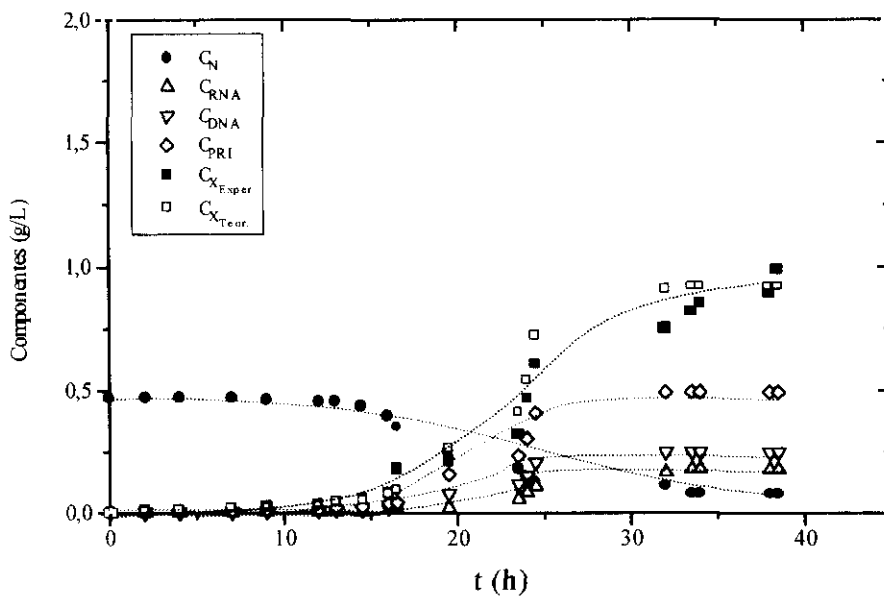


Figura 6.6.- Evolución de componentes intracelulares, fuente de nitrógeno y biomasa del experimento n° 7. Condiciones experimentales: $C_{N0}=475$ p.p.m., $T=28$ °C, $N=$ variable (210 r.p.m. inicial).

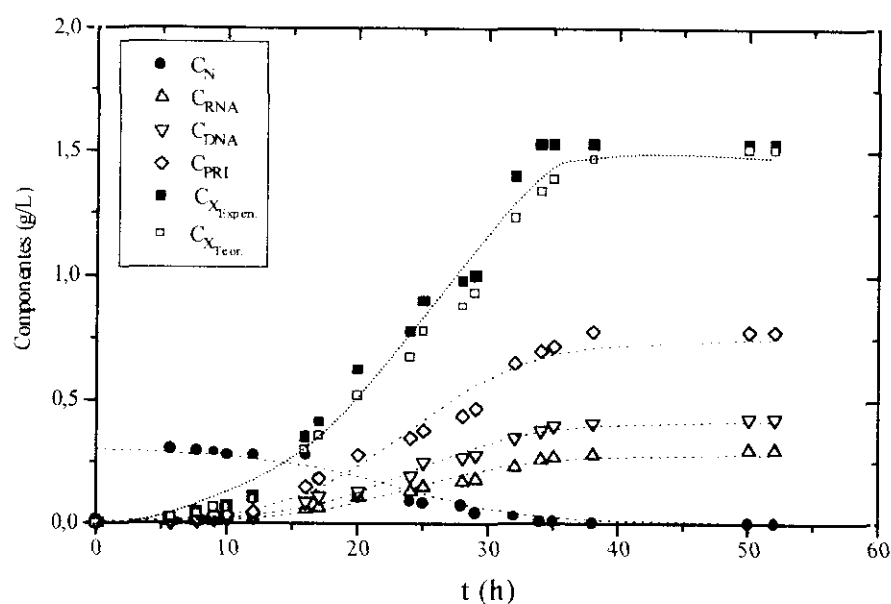


Figura 6.7.- Evolución de componentes intracelulares, fuente de nitrógeno y biomasa del experimento n° 1. Condiciones experimentales: $C_{N0}=257$ p.p.m., $T=25$ °C, $N=$ variable (210 r.p.m. inicial).

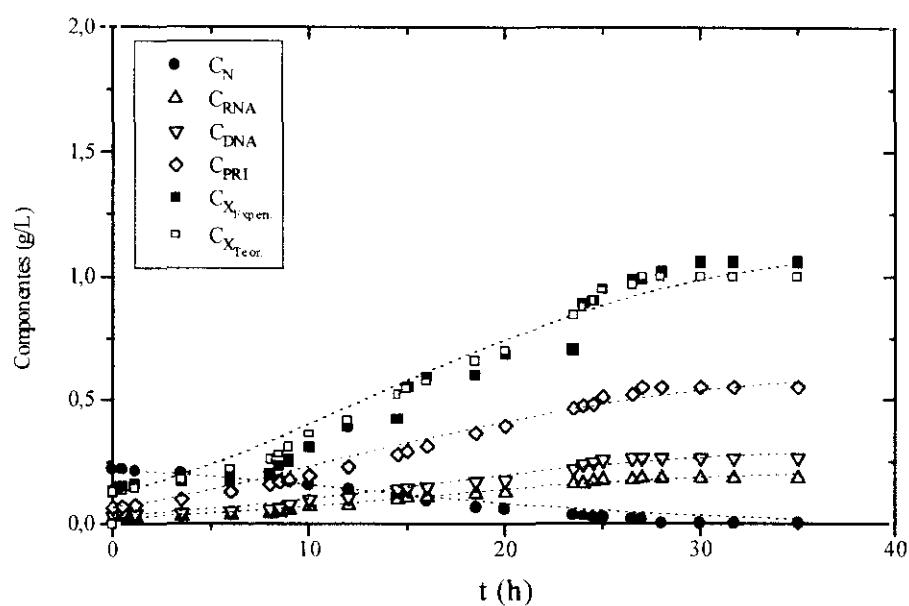


Figura 6.8.- Evolución de componentes intracelulares, fuente de nitrógeno y biomasa del experimento n° 2. Condiciones experimentales: $C_{N0}=257$ p.p.m., $T=31$ °C, $N=$ variable (210 r.p.m. inicial).

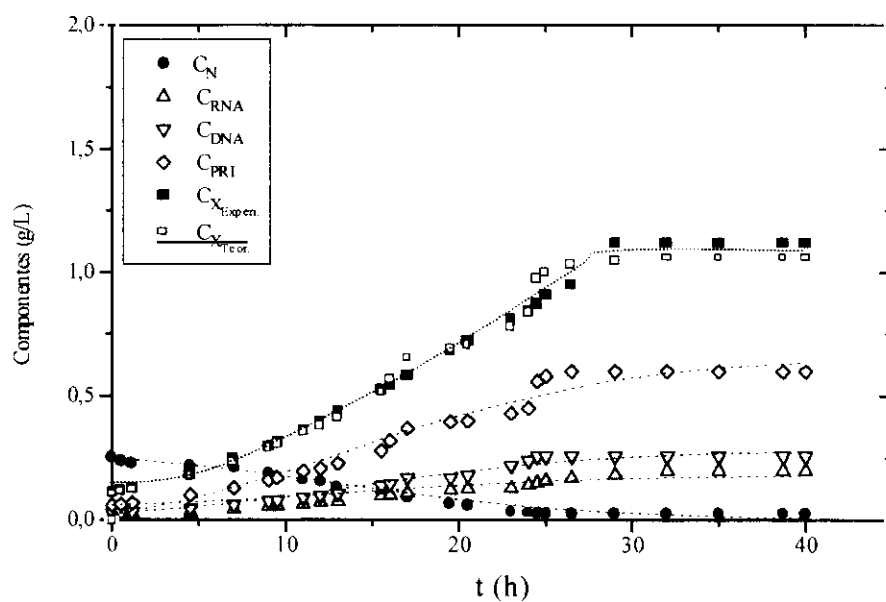


Figura 6.9.- Evolución de componentes intracelulares, fuente de nitrógeno y biomasa del experimento nº 4. Condiciones experimentales: $C_{N0}=257\text{p.p.m.}$, $T= 34\text{ }^{\circ}\text{C}$, $N=\text{variable}$ (210 r.p.m. inicial).

Considerando todos estos resultados, se puede llegar a plantear un esquema de reacción sencillo para explicar el crecimiento de la bacteria *Xanthomonas campestris*, tal como indica la Figura 6.10. Una parte del amonio va a ser empleado para la formación de **aminoácidos no formadores de bases nitrogenadas** (no formadores de ácidos nucleicos), en definitiva, de aminoácidos que formarán exclusivamente proteínas. Estas proteínas pueden ser intracelulares o extracelulares. Otra parte del amonio se emplea para la formación de **aminoácidos formadores de bases nitrogenadas** (las que formarán parte de ácidos nucleicos). Estas bases, a su vez, formarán por un lado RNA, por otro RNAm el cual se transcribe a DNA. Es decir, el RNA intracelular que se mide será, mayoritariamente, RNA que no evoluciona hacia DNA. Este esquema explica la forma de las curvas de proteínas y RNA, que no corresponden a productos formados en reacciones en serie.

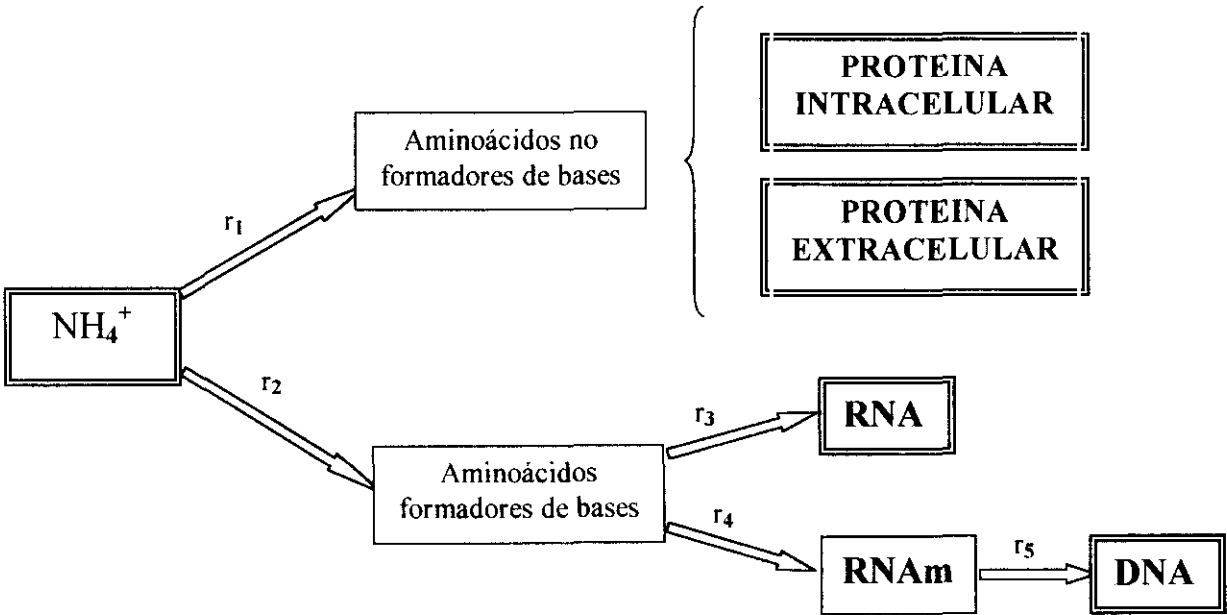


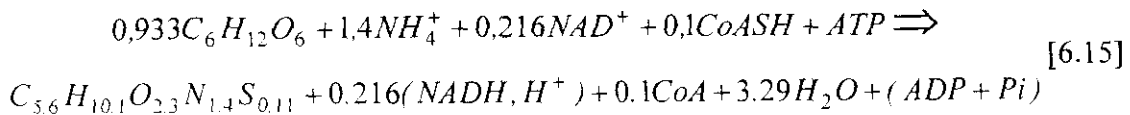
Figura 6.10.- Esquema de reacción simplificado para el Modelo Cinético de Célula de *Xanthomonas campestris*.

Una vez planteado el esquema de reacción simplificado y considerado el conocimiento que se tiene del metabolismo del microorganismo, se deben plantear las **relaciones estequiométricas** entre los diferentes compuestos.

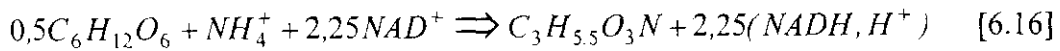
- En la síntesis de las bases que forman RNA sólo ceden átomos de carbono los que se han denominado **aminoácidos formadores de bases**, cuya síntesis se muestra en la ecuación [6.15]; mientras que el resto de aminoácidos que intervienen en la reacción sólo ceden grupos amino (NH_4^+), por lo que no se han considerado como fórmula molecular en la citada reacción de síntesis de bases de RNA.
- En la síntesis de bases del DNA, a partir de las bases del RNAm, se tiene en cuenta que se produce el mismo consumo de nitrógeno que si se estuviese sintetizando RNA. Si bien, se conoce que, en la formación de DNA a partir de RNAm, se produce una transformación en la base nitrogenada, es decir, el uracilo que forma parte de los nucleótidos del RNA, se transforma en timina en el DNA, para lo que es necesario un aporte de carbono e hidrógeno, que se supone que viene de la fuente de carbono original empleada (sacarosa). Además, es necesaria la presencia de un intermedio reducido (IntRed) que realice la reducción para pasar la ribosa a desoxiribosa (ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos).

Por tanto, el metabolismo del sustrato nitrogenado supone una estructuración de este componente en la biomasa, ya que es el citado compuesto nitrogenado el que produce aminoácidos y éstos dan lugar a proteínas y bases nitrogenadas, precursoras, de los ácidos nucleicos. Si se aplica *lumping* en el sistema, englobando aminoácidos, bases del RNA y bases del DNA en compuestos con fórmulas moleculares medias del total de moléculas que los forman, las reacciones globales, que tienen lugar en la ruta metabólica del nitrógeno, se pueden plantear las siguientes **relaciones estequiométricas (ecuaciones de filiación)**:

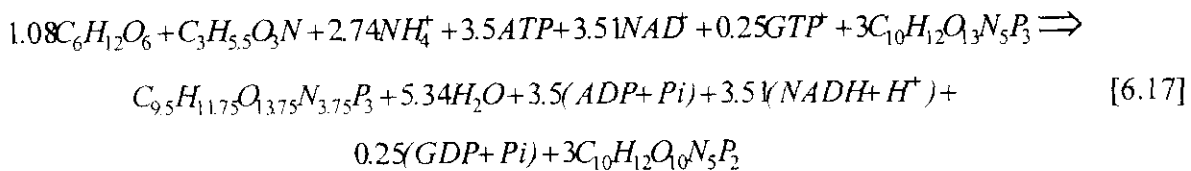
- Síntesis de aminoácidos **no formadores de bases** (r_1):



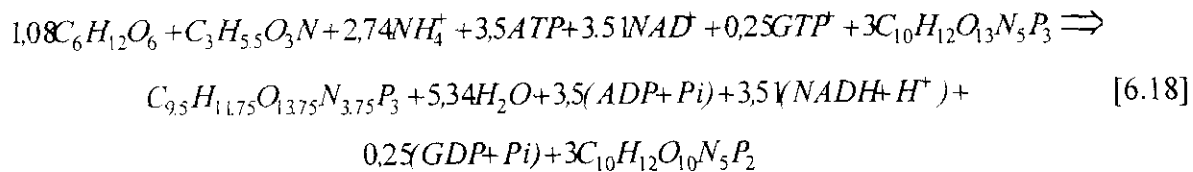
- Síntesis de aminoácidos **formadores de bases** (r_2):



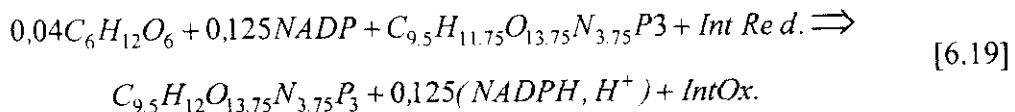
- Síntesis de **RNA** (r_3):



- Síntesis de **RNAm** (r_4):



- Síntesis de **DNA** (r_5):



6.2.2.- Propuesta de Ecuaciones Cinéticas

Ante la falta de antecedentes en la literatura, y el desconocimiento del tipo de ecuaciones cinéticas para las reacciones anteriores, se ha optado por aplicar el método antes citado de las **velocidades de reacción, junto con el método integral**. Dicho método es aplicable al sistema objeto de estudio debido a que el número de componentes clave puede hacerse igual al número de reacciones del esquema simplificado, suponiendo estado pseudoestacionario de alguno de los componentes de este sistema concreto.

La aplicación de la ecuación [6.8] a los NC componentes clave del modelo cinético conduce a grupos de ecuaciones independientes que permiten calcular los parámetros cinéticos del sistema por aplicación de una regresión lineal simple sin término independiente, de forma individual.

El primer paso a realizar es el planteamiento del sistema de ecuaciones diferenciales, para ello se han realizado dos suposiciones sobre el esquema simplificado de reacción anteriormente propuesto:

- **Simplificación 1 (MCC-1)**, donde se asume estado pseudoestacionario para RNAm:

$$\frac{dC_{RNA_m}}{dt} = R_{RNA_m} = 0 \quad [6.20]$$

puesto que

$$R_{RNA_m} = r_4 - r_5 \quad [6.21]$$

se obtiene:

$$r_4 = r_5 \quad [6.22]$$

Del mismo modo, se asume estado pseudoestacionario para los aminoácidos no formadores de bases:

$$\frac{dC_{aa_{NFB}}}{dt} = R_{aa_{NFB}} = 0 \quad [6.23]$$

puesto que

$$R_{aa, NFB} = r_2 - r_3 - r_4 \quad [6.24]$$

se obtiene:

$$r_2 = r_3 + r_4 = r_3 + r_5 \quad [6.25]$$

La velocidad de consumo de amonio viene dada por:

$$\frac{dC_{NH_4^+}}{dt} = -1,4 \cdot r_1 - r_2 - 2,75 \cdot r_3 - 2,75 \cdot r_4 \quad [6.26]$$

Sustituyendo las ecuaciones [6.22] y [6.25] en [6.26], se obtiene:

$$\frac{dC_{NH_4^+}}{dt} = -1,4 \cdot r_1 - 3,75 \cdot r_3 - 3,75 \cdot r_5 \quad [6.27]$$

La velocidad de formación del RNA por:

$$\frac{dC_{RNA}}{dt} = r_3 \quad [6.28]$$

Mientras que la velocidad de formación del DNA viene dada por:

$$\frac{dC_{DNA}}{dt} = r_5 \quad [6.29]$$

La velocidad de formación de proteínas intracelulares es:

$$\frac{dC_{PRI}}{dt} = r_1 - \frac{dC_{PRE}}{dt} \quad [6.30]$$

• **Simplificación 2 (MCC-2):**

Se asume estado pseudoestacionario sólo para RNAm (ecuaciones [6.20] a [6.22], en este caso no se supone esta simplificación para los aminoácidos no formadores de bases, por lo que la velocidad de consumo de amonio vendrá dada de forma diferente al modelo MCC-1, mientras que el resto de velocidades (para RNA, DNA y Proteínas intracelulares) son las mismas que en el caso anterior.

Para el amonio:

$$\frac{dC_{NH_4^+}}{dt} = -1,4 \cdot r_1 - r_2 - 2,75 \cdot r_3 - 2,75 \cdot r_4 = -1,4 \cdot r_1 - r_2 - 2,75 \cdot r_3 - 2,75 \cdot r_5 \quad [6.31]$$

Una vez propuestas las velocidades de producción para cada componente clave es preciso plantear estas ecuaciones en términos de velocidades de reacción, para ello se aplica la ecuación [6.8] para obtener de forma individual cada una de estas velocidades.

• **Simplificación 1 (MCC-1):**

- r_{S1} viene dada por:

$$r_{S1} = \int_0^t r_1 \cdot dt = (C_{PRI} - C_{PRI0}) + (C_{PRE}) \quad [6.32]$$

- r_{S3} se obtiene al despejar de la ecuación [6.28], obteniéndose la expresión:

$$r_{S3} = \int_0^t r_3 \cdot dt = C_{RNA} - C_{RNA0} \quad [6.33]$$

- r_{S5} se obtiene al despejar de la ecuación [6.29], obteniéndose la ecuación:

$$r_{S5} = \int_0^t r_5 \cdot dt = C_{DNA} - C_{DNA0} \quad [6.34]$$

- **Simplificación 2 (MCC-2):**

Tanto r_{S1} como r_{S3} y r_{S5} vienen dadas de la misma forma que en MCC-1, es decir por las ecuaciones [6.32], [6.33] y [6.34], respectivamente.

La diferencia entre las dos simplificaciones la marca la ecuación cinética r_2 , la cual viene dada por la siguiente expresión obtenida al despejar de la ecuación [6.31]:

$$r_{S2} = \int r_2 \cdot dt = -(2,75 \cdot (C_{RNA} - C_{RNA0}) + 2,75 \cdot (C_{DNA} - C_{DNA0}) + 1,4 \cdot (C_{PRI} - C_{PRI0})) \quad [6.35]$$

La aplicación de este método a los datos experimentales obtenidos en este trabajo fue realizada en **simple respuesta empleando el método de integral, con una subrutina tipo Simpson**. Las funciones ($f(C_j)$) que se han probado para cada una de las velocidades de reacción han sido:

Para las ecuaciones r_1 , r_3 , y r_5 , (ecuaciones [6.32], [6.33] y [6.34], respectivamente), válidas tanto para MCC-1 como para MCC-2, se han probado tres cinéticas diferentes:

- **Potencial 1:**

$$\int_0^t k_i \cdot C_N \cdot dt = \sum v_{ij} \cdot (C_j - C_{j0}); (i = 1 \dots NR) \quad [6.36]$$

- **Potencial 2:**

$$\int_0^t k_i \cdot C_X \cdot C_N \cdot dt = \sum v_{ij} \cdot (C_j - C_{j0}); (i = 1 \dots NR) \quad [6.37]$$

- **Hiperbólica:**

$$\int_0^t k_i \cdot C_X \cdot \frac{C_N}{C_N + K_i} dt = \sum v_{ij} \cdot (C_j - C_{j0}); (i = 1 \dots NR) \quad [6.38]$$

Para r_2 , calculada sólo para la simplificación 2 (MCC-2), como ya se ha indicado, se han realizado ajustes con dos cinéticas potenciales del tipo que indica la ecuación [6.36] y la [6.37].

Debido a que todos los experimentos presentan resultados similares, se han elegido dos experimentos como representativos para observar los resultados de la aplicación de esta metodología, y para evitar alargar excesivamente el desarrollo de la exposición de este capítulo.

Concretamente el experimento n° 2, realizado a 28°C y con 257 p.p.m. de amonio, y el experimento n° 4, realizado a 34°C y con 257 p.p.m. de amonio.

Los resultados obtenidos para la **velocidad de reacción r_1** , aplicando este método y probando las cinéticas que se han indicado, se muestran en las Tablas 6.8 a 6.14, donde se observan los valores obtenidos para los parámetros de cada una de las funciones probadas.

Todos los parámetros cumplen las restricciones estadísticas impuestas, se observa que el valor de SRC (suma de residuos al cuadrado) es menor para las cinéticas hiperbólica y potencial 2. Esto se corrobora observando que las formas de las curvas, tanto en forma integral (Figuras 6.11 y 6.12), como derivadas (Figura 6.13 y 6.14) se asemejan mucho más a la función que para el caso de la cinética potencial 1, cuya suma de residuos al cuadrado es mucho mayor.

Las Figuras 6.11 y 6.12 muestran los resultados, por tanto, para el valor de la integral de r_1 para el experimento n° 2 (28°C, 257 p.p.m. de amonio) y el experimento n° 4 (34°C y 257 p.p.m.), respectivamente. Las ecuaciones hiperbólica y potencial 2 son las que permiten obtener mejor resultado respecto al acercamiento de las curvas a la de la función.

En cuanto al valor de r_1 ya derivado (Figuras 6.13 y 6.14), se observa que la forma de la curva que corresponde a la ecuación potencial 1 presenta una forma descendente, indicando que no es posible considerar esta cinética en el modelo propuesto, mientras que las cinéticas hiperbólica y potencial 2 reproducen bien la forma que presenta la función, siendo, en principio, posible considerar cualquiera de las dos cinéticas para el modelo cinético.

Tabla 6.8.- Parámetros cinéticos de r_1 calculados por ajuste de los datos del experimento n° 1. en simple respuesta a diferentes ecuaciones cinéticas. Condiciones experimentales: $T=25^\circ \text{C}$, $C_N=257$ p.p.m de amonio, $N=$ variable (210 r.p.m. inicial) modelo de célula.

Cinética	Valores de los parámetros			t Student		F Fischer		SRC
	Máx	Ópt	Mín	Obt.	Teor.	Obt.	Teor.	
$k_1 \cdot C_N$	$k_1=0,132$	$k_1=0,129$	$k_1=0,126$	$4,3 \cdot 10^4$	2,086	925	4,35	0,92
$k_1 \cdot C_X \cdot C_N$	$k_1=1,097$	$k_1=0,977$	$k_1=0,857$	$6,3 \cdot 10^3$	2,086	2432	4,35	0,23
$k_1 \cdot C_X \cdot \frac{C_N}{C_N + K_1}$	$k_1=0,035$ $K_1=0,003$	$k_1=0,028$ $K_1=0,002$	$k_1=0,021$ $K_1=0,001$	$8,1 \cdot 10^3$	2,093	3331	4,38	0,12

Tabla 6.9.- Parámetros cinéticos de r_1 calculados por ajuste de los datos del experimento nº 2. en simple respuesta a diferentes ecuaciones cinéticas. Condiciones experimentales: $T=28^{\circ}\text{ C}$, $C_N=257\text{ p.p.m}$ de amonio, $N=$ variable (210 r.p.m. inicial).

Cinética	Valores de los parámetros			t Student		F Fischer		SRC
	Máx	Ópt	Mín	Obt.	Teor.	Obt.	Teor.	
$k_1 \cdot C_N$	$k_1=0.152$	$k_1=0.150$	$k_1=0.148$	$1.1 \cdot 10^4$	2.074	1120	4.54	0.85
$k_1 \cdot C_X \cdot C_N$	$k_1=0.44$	$k_1=0.43$	$k_1=0.45$	$8.3 \cdot 10^3$	2.074	1332	4.54	0.092
$k_1 \cdot C_X \cdot \frac{C_N}{C_N+K_1}$	$k_1=0.051$ $K_1=0.005$	$k_1=0.050$ $K_1=0.005$	$k_1=0.049$ $K_1=0.005$	$3.1 \cdot 10^2$	2.080	2331	4.60	0.012

Tabla 6.10.- Parámetros cinéticos r_1 calculados por ajuste de los datos del experimento nº 3 en simple respuesta a diferentes ecuaciones cinéticas. Condiciones experimentales: $T=31^{\circ}\text{ C}$, $C_N=257\text{ p.p.m}$ de amonio, $N=$ variable (210 r.p.m. inicial) modelo de célula.

Cinética	Valores de los parámetros			t Student		F Fischer		SRC
	Máx	Ópt	Mín	Obt.	Teor.	Obt.	Teor.	
$k_1 \cdot C_N$	$k_1=0.315$	$k_1=0.195$	$k_1=0.075$	$4.3 \cdot 10^4$	2.080	925	4.35	1.5
$k_1 \cdot C_X \cdot C_N$	$k_1=0.704$	$k_1=0.590$	$k_1=0.470$	$6.3 \cdot 10^3$	2.080	2432	4.35	0.23
$k_1 \cdot C_X \cdot \frac{C_N}{C_N+K_1}$	$k_1=0.450$ $K_1=0.600$	$k_1=0.310$ $K_1=0.390$	$k_1=0.170$ $K_1=0.180$	$8.1 \cdot 10^3$	2.086	3331	3.52	0.12

Tabla 6.11.- Parámetros cinéticos de r_1 calculados por ajuste de los datos del experimento nº 4 en simple respuesta a diferentes ecuaciones cinéticas. Condiciones experimentales: $T=34^{\circ}\text{ C}$, $C_N=257\text{ p.p.m}$ de amonio, $N=$ variable (210 r.p.m. inicial) modelo de célula.

Cinética	Valores de los parámetros			t Student		F Fischer		SRC
	Máx	Ópt	Mín	Obt.	Teor.	Obt.	Teor.	
$k_1 \cdot C_N$	$k_1=0.143$	$k_1=0.131$	$k_1=0.0.11$	$4.3 \cdot 10^4$	2.060	925	4.35	3.75
$k_1 \cdot C_X \cdot C_N$	$k_1=0.237$	$k_1=0.150$	$k_1=0.063$	$6.3 \cdot 10^3$	2.060	2432	4.35	1.23
$k_1 \cdot C_X \cdot \frac{C_N}{C_N+K_1}$	$k_1=0.268$ $K_1=0.093$	$k_1=0.173$ $K_1=0.063$	$k_1=0.095$ $K_1=0.033$	$8.1 \cdot 10^3$	2.064	3331	3.52	0.82

Tabla 6.12.- Parámetros cinéticos de r_1 calculados por ajuste de los datos del experimento n° 2. en simple respuesta a diferentes ecuaciones cinéticas. Condiciones experimentales: $T=28^\circ \text{C}$, $C_N=65$ p.p.m de amonio, $N=$ variable (210 r.p.m. inicial), al modelo de célula.

Cinética	Valores de los parámetros			t Student		F Fischer		SRC
	Máx	Ópt	Mín	Obt.	Teor.	Obt.	Teor.	
$k_1 \cdot C_N$	$k_1=0,18$	$k_1=0,131$	$k_1=0,082$	$4,3 \cdot 10^4$	2,11	925	4,38	2,95
$k_1 \cdot C_X \cdot C_N$	$k_1=0,288$	$k_1=0,150$	$k_1=0,138$	$6,3 \cdot 10^3$	2,11	2432	4,38	0,55
$k_1 \cdot C_X \cdot \frac{C_N}{C_N+K_1}$	$k_1=0,178$ $K_1=0,066$	$k_1=0,173$ $K_1=0,063$	$k_1=0,167$ $K_1=0,060$	$8,1 \cdot 10^3$	2,12	3331	3,55	0,182

Tabla 6.13.- Parámetros cinéticos de r_1 calculados por ajuste de los datos del experimento n° 2. en simple respuesta a diferentes ecuaciones cinéticas. Condiciones experimentales: $T=28^\circ \text{C}$, $C_N=130$ p.p.m de amonio, $N=$ variable (210 r.p.m. inicial), al modelo de célula.

Cinética	Valores de los parámetros			t Student		F Fischer		SRC
	Máx	Ópt	Mín	Obt.	Teor.	Obt.	Teor.	
$k_1 \cdot C_N$	$k_1=0,900$	$k_1=0,900$	$k_1=0,900$	$2 \cdot 10^2$	2,069	925	3,68	1,3
$k_1 \cdot C_X \cdot C_N$	$k_1=5,830$	$k_1=5,800$	$k_1=5,770$	$4 \cdot 10^3$	2,069	1223	3,68	0,23
$k_1 \cdot C_X \cdot \frac{C_N}{C_N+K_1}$	$k_1=0,069$ $K_1=0,010$	$k_1=0,069$ $K_1=0,010$	$k_1=0,069$ $K_1=0,010$	$3 \cdot 10^2$	2,074	1325	3,34	0,12

Tabla 6.14.- Parámetros de r_1 calculados por ajuste de los datos del experimento n° 2. en simple respuesta a diferentes ecuaciones cinéticas. Condiciones experimentales: $T=28^\circ \text{C}$, $C_N=475$ p.p.m de amonio, $N=$ variable (210 r.p.m. inicial), al modelo de célula

Cinética	Valores de los parámetros			t Student		F Fischer		SRC
	Máx	Ópt	Mín	Obt.	Teor.	Obt.	Teor.	
$k_1 \cdot C_N$	$k_1=0,131$	$k_1=0,131$	$k_1=0,131$	$4,3 \cdot 10^4$	2,080	955	4,30	0,72
$k_1 \cdot C_X \cdot C_N$	$k_1=0,151$	$k_1=0,150$	$k_1=0,149$	$6,3 \cdot 10^3$	2,080	2432	4,30	0,11
$k_1 \cdot C_X \cdot \frac{C_N}{C_N+K_1}$	$k_1=0,173$ $K_1=0,063$	$k_1=0,173$ $K_1=0,063$	$k_1=0,173$ $K_1=0,063$	$8,1 \cdot 10^3$	2,086	3331	3,37	0,082

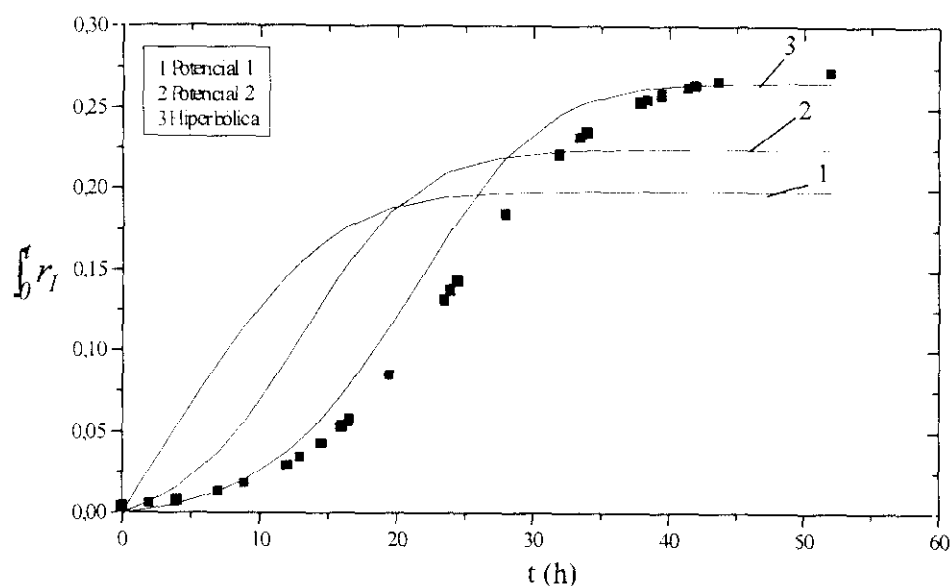


Figura 6.11.- Evolución mostrada por la integral de r_1 con el tiempo para el experimento n° 2, realizado a 28°C y 257 p.p.m. de amonio inicial probando diferentes cinéticas y su comparación con la función correspondiente a proteínas.

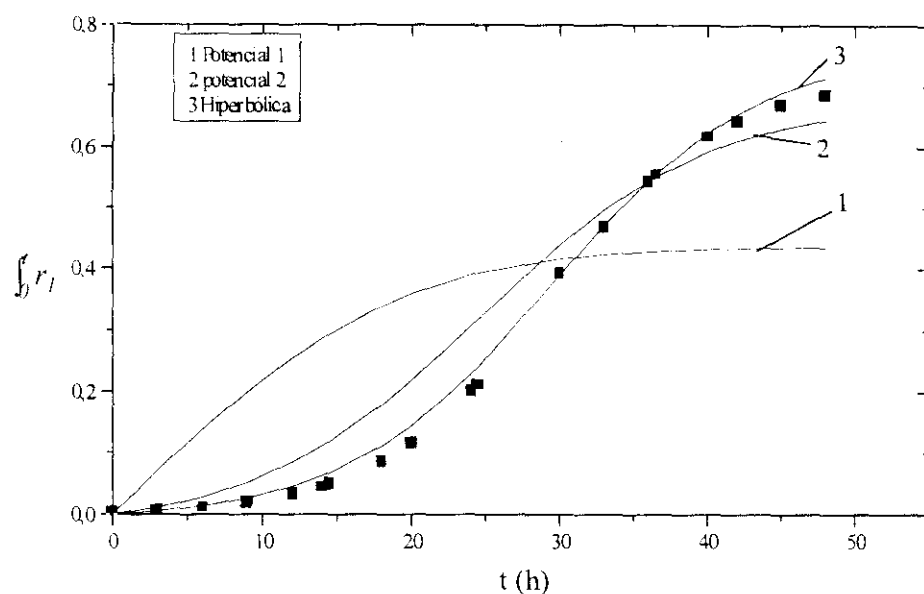


Figura 6.12.- Evolución mostrada por la integral r_1 con el tiempo para el experimento n° 4, realizado a 34°C y 257 p.p.m. de amonio inicial probando diferentes cinéticas y su comparación con la función correspondiente a proteínas.

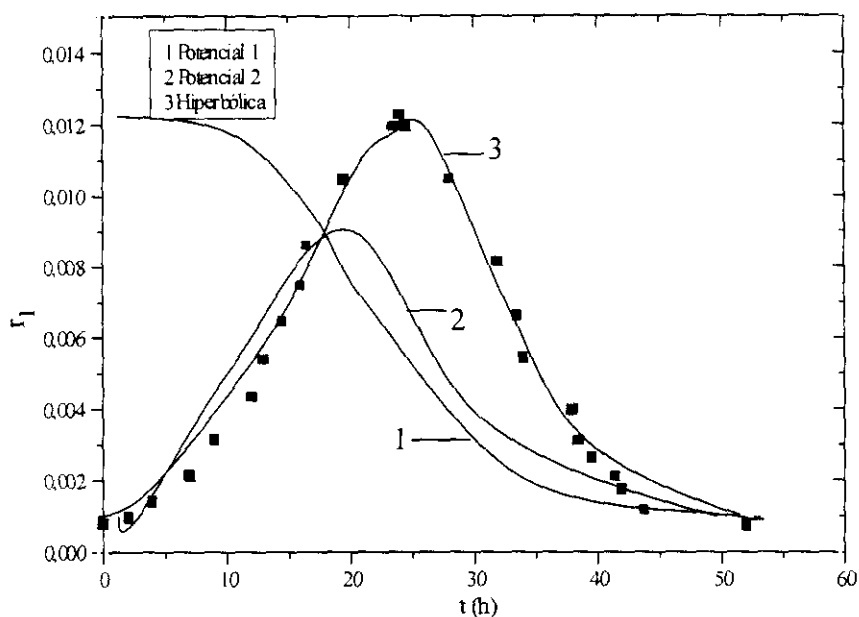


Figura 6.13.- Evolución mostrada por r_{s1} con el tiempo para el **experimento n° 2**, realizado a **28°C** y **257 p.p.m.** de amonio inicial probando diferentes cinéticas y su comparación con la función correspondiente a proteínas.

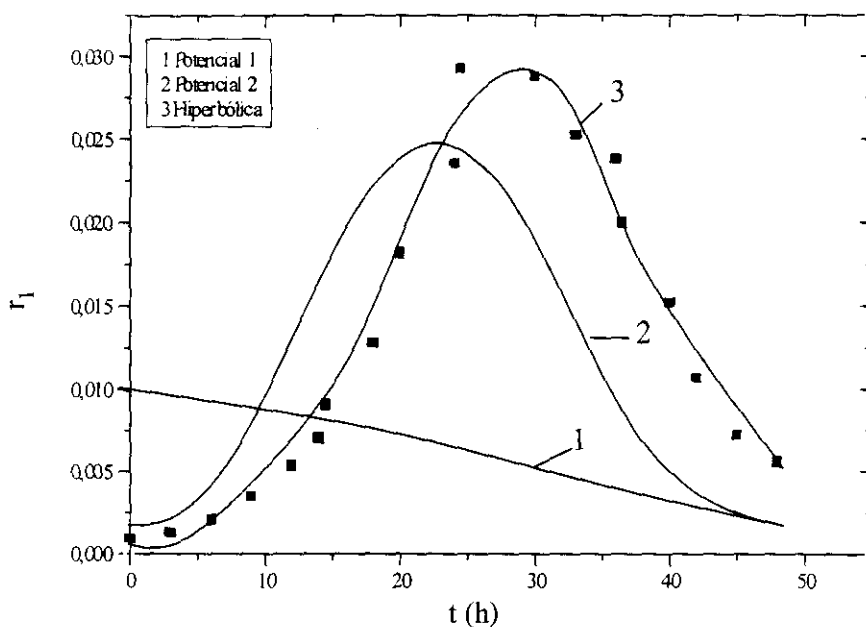


Figura 6.14.- Evolución mostrada por r_{s1} con el tiempo para el **experimento n° 4**, realizado a **34°C** y **257 p.p.m.** de amonio inicial probando diferentes cinéticas y su comparación con la función correspondiente a proteínas .

Los resultados obtenidos para la **velocidad de reacción r_3 (de formación de RNA)**, aplicando este método y probando las cinéticas que se han indicado, se muestran en las Tablas 6.15 a 6.21, donde se observan los valores obtenidos para los parámetros de cada una de las funciones probadas. En todos los experimentos se superan los valores estadísticos teóricos de la t Student y de la F de Fischer, obteniéndose valores significativamente bajos de SRC. La cinética potencial 1 es la que muestra valores más altos de la suma de residuos al cuadrado, lo que indica que describe peor la forma de la función para r_3 , que las otras dos cinéticas probadas.

Los resultados de la integral de r_{S3} para cada uno de los experimentos tomados como representativos (experimento n° 2 y n° 4), se muestran en las Figuras 6.15 y 6.16, mientras que la función r_3 , para dichos experimentos, aparecen en las Figuras 6.17 y 6.18. Donde se puede observar algo similar a lo que ocurría con la velocidad de reacción r_1 : esto es, las cinéticas que mejor reproducen la forma de la función son la hiperbólica y la potencial 2, mientras que la curva para la ecuación potencial 1, se aleja bastante de la forma de la función, pues es una línea descendente.

Tabla 6.15.- Parámetros cinéticos de r_3 calculados por ajuste de los datos del experimento n° 1. en simple respuesta a diferentes ecuaciones cinéticas. Condiciones experimentales: $T=25^{\circ}\text{ C}$, $C_N=257\text{ p.p.m de amonio}$, $N= \text{variable (210 r.p.m. inicial)}$.

Cinética	Valores de los parámetros			t Student		F Fischer		SRC
	Máx	Ópt	Mín	Obt.	Teor.	Obt.	Teor.	
$k_1 \cdot C_N$	$k_1=0,065$	$k_1=0,0348$	$k_1=0,004$	$1,5 \cdot 10^2$	2,086	1120	4,35	0,28
$k_1 \cdot C_X \cdot C_N$	$k_1=0,295$	$k_1=0,259$	$k_1=0,223$	$7,3 \cdot 10^3$	2,086	3332	4,35	0,08
$k_1 \cdot C_N \cdot \frac{C_N}{C_N + K_1}$	$k_1=0,035$ $K_1=0,112$	$k_1=0,0344$ $K_1=0,0396$	$k_1=0,033$ $K_1=0,033$	$4,1 \cdot 10^3$	2,093	4321	4,38	0,04

Tabla 6.16.- Parámetros cinéticos de r_3 calculados por ajuste de los datos del experimento n° 2. en simple respuesta a diferentes ecuaciones cinéticas. Condiciones experimentales: $T=28^\circ \text{C}$, $C_N=257$ p.p.m de amonio, $N=$ variable (210 r.p.m. inicial).

Cinética	Valores de los parámetros			t Student		F Fischer		SRC
	Máx	Ópt	Mín	Obt.	Teor.	Obt.	Teor.	
$k_1 \cdot C_N$	$k_1=0,152$	$k_1=0,045$	$k_1=0,148$	$1,1 \cdot 10^2$	2,074	1120	4,54	1,8
$k_1 \cdot C_X \cdot C_N$	$k_1=0,44$	$k_1=0,129$	$k_1=0,45$	$8,3 \cdot 10^3$	2,074	1332	4,54	0,92
$k_1 \cdot C_X \cdot \frac{C_N}{C_N+K_1}$	$k_1=0,051$ $K_1=0,005$	$k_1=0,013$ $K_1=0,080$	$k_1=0,049$ $K_1=0,005$	$3,1 \cdot 10^2$	2,080	2331	4,60	0,012

Tabla 6.17.- Parámetros cinéticos de r_3 calculados por ajuste de los datos del experimento n° 3. en simple respuesta a diferentes ecuaciones cinéticas. Condiciones experimentales: $T=31^\circ \text{C}$, $C_N=257$ p.p.m de amonio, $N=$ variable (210 r.p.m. inicial).

Cinética	Valores de los parámetros			t Student		F Fischer		SRC
	Máx	Ópt	Mín	Obt.	Teor.	Obt.	Teor.	
$k_1 \cdot C_N$	$k_1=0,052$	$k_1=0,0408$	$k_1=0,028$	$3,5 \cdot 10^2$	2,080	820	4,35	0,84
$k_1 \cdot C_X \cdot C_N$	$k_1=0,224$	$k_1=0,124$	$k_1=0,024$	$5,3 \cdot 10^3$	2,080	1332	4,35	0,12
$k_1 \cdot C_X \cdot \frac{C_N}{C_N+K_1}$	$k_1=0,026$ $K_1=0,076$	$k_1=0,023$ $K_1=0,074$	$k_1=0,021$ $K_1=0,073$	$7,1 \cdot 10^4$	2,086	5221	3,52	0,03

Tabla 6.18.- Parámetros cinéticos de r_3 calculados por ajuste de los datos del experimento n° 4. en simple respuesta a diferentes ecuaciones cinéticas. Condiciones experimentales: $T=34^\circ \text{C}$, $C_N=257$ p.p.m de amonio, $N=$ variable (210 r.p.m. inicial).

Cinética	Valores de los parámetros			t Student		F Fischer		SRC
	Máx	Ópt	Mín	Obt.	Teor.	Obt.	Teor.	
$k_1 \cdot C_N$	$k_1=0,039$	$k_1=0,039$	$k_1=0,039$	$1,2 \cdot 10^3$	2,060	725	4,35	2,5
$k_1 \cdot C_X \cdot C_N$	$k_1=0,455$	$k_1=0,454$	$k_1=0,453$	$2,3 \cdot 10^3$	2,060	1536	4,35	0,22
$k_1 \cdot C_X \cdot \frac{C_N}{C_N+K_1}$	$k_1=0,049$ $K_1=0,057$	$k_1=0,049$ $K_1=0,057$	$k_1=0,049$ $K_1=0,057$	$4,1 \cdot 10^5$	2,064	2325	3,52	0,43

Tabla 6.19.- Parámetros cinéticos de r_3 calculados por ajuste de los datos del experimento nº 5. en simple respuesta a diferentes ecuaciones cinéticas. Condiciones experimentales: $T=28^{\circ}\text{ C}$, $C_N=65\text{ p.p.m}$ de amonio, $N= \text{variable}$ (210 r.p.m. inicial).

Cinética	Valores de los parámetros			t Student		F Fischer		SRC
	Máx	Ópt	Mín	Obt.	Teor.	Obt.	Teor.	
$k_1 \cdot C_N$	$k_1=0.039$	$k_1=0.039$	$k_1=0.039$	$1.2 \cdot 10^3$	2,11	725	4,38	3,1
$k_1 \cdot C_X \cdot C_N$	$k_1=0.454$	$k_1=0.454$	$k_1=0.454$	$2.3 \cdot 10^3$	2,11	1536	4,38	0.22
$k_1 \cdot C_X \cdot \frac{C_N}{C_N+K_1}$	$k_1=0.049$ $K_1=0,057$	$k_1=0.049$ $K_1=0,057$	$k_1=0.049$ $K_1=0,057$	$4,1 \cdot 10^5$	2,12	2325	3,55	0.43

Tabla 6.20.- Parámetros cinéticos de r_3 calculados por ajuste de los datos del experimento nº 6. en simple respuesta a diferentes ecuaciones cinéticas. Condiciones experimentales: $T=28^{\circ}\text{ C}$, $C_N=130\text{ p.p.m}$ de amonio, $N= \text{variable}$ (210 r.p.m. inicial).

Cinética	Valores de los parámetros			t Student		F Fischer		SRC
	Máx	Ópt	Mín	Obt.	Teor.	Obt.	Teor.	
$k_1 \cdot C_N$	$k_1=0.071$	$k_1=0.070$	$k_1=0.070$	$3 \cdot 10^2$	2.069	725	3,68	0,98
$k_1 \cdot C_X \cdot C_N$	$k_1=0.180$	$k_1=1.78$	$k_1=1,76$	$1 \cdot 10^3$	2,069	1536	3,68	0,12
$k_1 \cdot C_X \cdot \frac{C_N}{C_N+K_1}$	$k_1=0.0213$ $K_1=0,0002$	$k_1=0.0212$ $K_1=0,0002$	$k_1=0,021$ $K_1=0.0002$	$2 \cdot 10^3$	2.074	2325	3,34	0.03

Tabla 6.21.- Parámetros cinéticos de r_3 calculados por ajuste de los datos del experimento nº 7. en simple respuesta a diferentes ecuaciones cinéticas. Condiciones experimentales: $T=28^{\circ}\text{ C}$, $C_N=475\text{ p.p.m}$ de amonio, $N= \text{variable}$ (210 r.p.m. inicial).

Cinética	Valores de los parámetros			t Student		F Fischer		SRC
	Máx	Ópt	Mín	Obt.	Teor.	Obt.	Teor.	
$k_1 \cdot C_N$	$k_1=0.0417$	$k_1=0,0417$	$k_1=0,0417$	$2 \cdot 10^2$	2.080	725	4,30	4,2
$k_1 \cdot C_X \cdot C_N$	$k_1=0.395$	$k_1=0,392$	$k_1=0.289$	$3 \cdot 10^3$	2,080	1536	4,30	0,33
$k_1 \cdot C_X \cdot \frac{C_N}{C_N+K_1}$	$k_1=0.019$ $K_1=0,002$	$k_1=0.019$ $K_1=0,002$	$k_1=0,019$ $K_1=0.002$	$4 \cdot 10^3$	2.086	2325	3,37	0,11

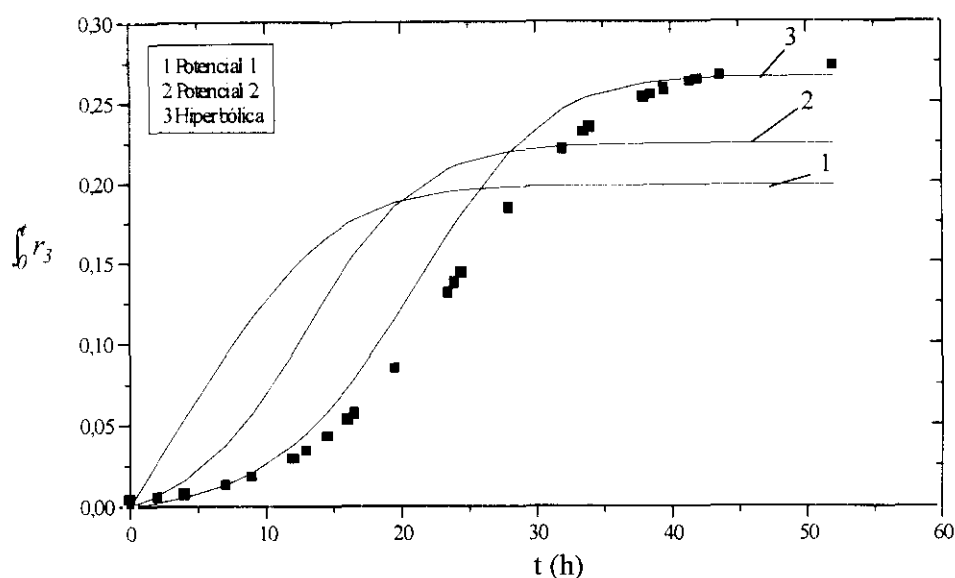


Figura 6.15.- Evolución mostrada por la integral de r_3 con el tiempo para el experimento n° 2, realizado a 28°C y 257 p.p.m. de amonio inicial probando diferentes cinéticas y su comparación con la función correspondiente.

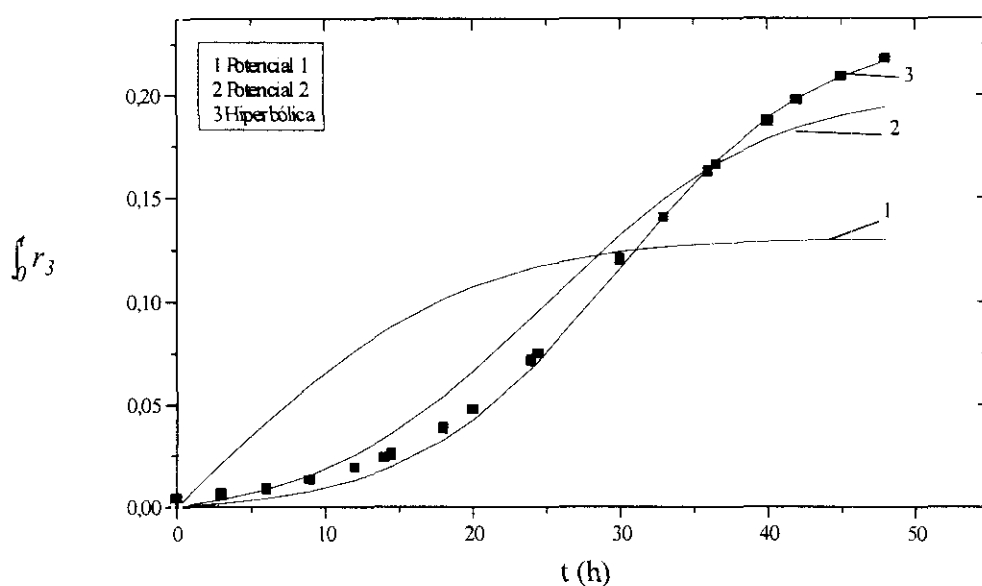


Figura 6.16.- Evolución mostrada por la integral de r_3 con el tiempo para el experimento n° 4, realizado a 34°C y 257 p.p.m. de amonio inicial probando diferentes cinéticas y su comparación con la función correspondiente.

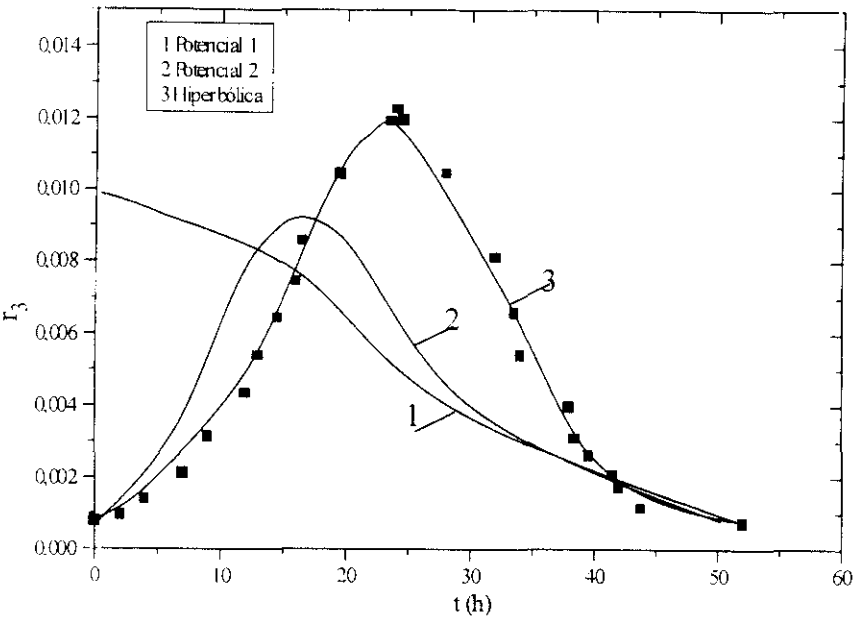


Figura 6.17.- Evolución mostrada por r_{s3} con el tiempo para el **experimento n° 2**, realizado a 28°C y 257 p.p.m. de amonio inicial probando diferentes cinéticas y su comparación con la función correspondiente.

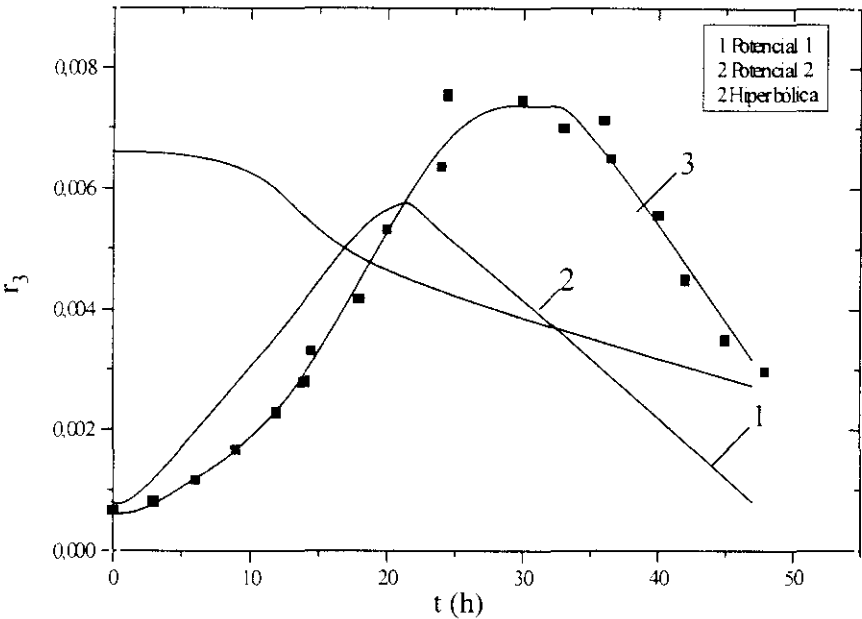


Figura 6.18.- Evolución mostrada por r_{s3} con el tiempo para el **experimento n° 4**, realizado a 34°C y 257 p.p.m. de amonio inicial probando diferentes cinéticas y su comparación con la función correspondiente.

Los resultados obtenidos para la **reacción r_5 (para la formación de DNA)**, aplicando el método de las velocidades de reacción para determinar las cinéticas que pueden ser empleadas en el modelo cinético de célula planteado, se muestran en las Tablas 6.22 a 6.28, donde se presentan los valores obtenidos para los parámetros de cada una de las funciones probadas. En todos los experimentos se superan los valores estadísticos teóricos de t Student y de F de Fischer de los parámetros de cada cinética, siendo algo peor las estadísticas obtenidas para los parámetros correspondientes a la ecuación potencial 1.

Las formas de las curvas para cada una de las cinéticas, en comparación con la función se muestran en las Figuras 6.19 y 6.20 (para la integral de r_5) y las Figuras 6.21 y 6.22 para r_5 (derivada). Tal como ocurría en los dos casos anteriores se observa que las cinéticas que mejor describen la forma de la función ($f(C_j)$) son las correspondientes a la ecuación hiperbólica y a la potencial 2.

Los resultados que se muestran, como en los casos anteriores, son los correspondientes al experimento n° 2 (28°C, 257 p.p.m. de amonio) y al experimento n° 4 (34°C y 257 p.p.m.). Al igual que en las dos velocidades de reacción anteriores los resultados son similares para todos los experimentos, por lo que se muestran unos resultados representativos.

Tabla 6.22.- Parámetros cinéticos de r_5 calculados por ajuste de los datos del experimento n° 1 en simple respuesta a diferentes ecuaciones cinéticas. Condiciones experimentales: T=25° C, C_N =257 p.p.m de amonio, N= variable (210 r.p.m. inicial).

Cinética	Valores de los parámetros			t Student		F Fischer		SRC
	Máx	Ópt	Mín	Obt.	Teor.	Obt.	Teor.	
$k_1 \cdot C_A$	$k_1=0,152$	$k_1=0,0922$	$k_1=0,148$	$4,1 \cdot 10^2$	2,086	850	4,35	0,11
$k_1 \cdot C_A \cdot C_N$	$k_1=0,44$	$k_1=0,348$	$k_1=0,45$	$5,3 \cdot 10^3$	2,086	2232	4,35	0,075
$k_1 \cdot C_A \cdot \frac{C_N}{C_N + K_1}$	$k_1=0,060$ $K_1=0,058$	$k_1=0,060$ $K_1=0,058$	$k_1=0,060$ $K_1=0,0$	$5,1 \cdot 10^3$	2,093	5241	4,38	0,03

Tabla 6.23.- Parámetros cinéticos de r_5 calculados por ajuste de los datos del experimento nº 2 en simple respuesta a diferentes ecuaciones cinéticas. Condiciones experimentales: T=28° C, $C_N=257$ p.p.m de amonio, N= variable (210 r.p.m. inicial).

Cinética	Valores de los parámetros			t Student		F Fischer		SRC
	Máx	Ópt	Mín	Obt.	Teor.	Obt.	Teor.	
$k_1 \cdot C_N$	$k_1=0,152$	$k_1=0,0168$	$k_1=0,148$	$1,1 \cdot 10^4$	2,074	1120	4,54	0,8
$k_1 \cdot C_X \cdot C_N$	$k_1=0,44$	$k_1=0,175$	$k_1=0,45$	$8,3 \cdot 10^3$	2,074	1332	4,54	0,19
$k_1 \cdot C_X \cdot \frac{C_N}{C_N+K_1}$	$k_1=0,051$ $K_1=0,005$	$k_1=0,0214$ $K_1=0,0075$	$k_1=0,049$ $K_1=0,005$	$3,1 \cdot 10^2$	2,080	2331	4,60	0,01

Tabla 6.24.- Parámetros cinéticos de r_5 calculados por ajuste de los datos del experimento nº 3 en simple respuesta a diferentes ecuaciones cinéticas. Condiciones experimentales: T=31° C, $C_N=257$ p.p.m de amonio, N= variable (210 r.p.m. inicial).

Cinética	Valores de los parámetros			t Student		F Fischer		SRC
	Máx	Ópt	Mín	Obt.	Teor.	Obt.	Teor.	
$k_1 \cdot C_N$	$k_1=0,057$	$k_1=0,057$	$k_1=0,057$	$2,1 \cdot 10^3$	2,080	1750	4,35	0,23
$k_1 \cdot C_X \cdot C_N$	$k_1=0,179$	$k_1=0,178$	$k_1=0,176$	$3,3 \cdot 10^3$	2,080	3232	4,35	0,08
$k_1 \cdot C_X \cdot \frac{C_N}{C_N+K_1}$	$k_1=0,037$ $K_1=0,087$	$k_1=0,037$ $K_1=0,087$	$k_1=0,037$ $K_1=0,037$	$6,1 \cdot 10^3$	2,086	4241	3,52	0,025

Tabla 6.25.- Parámetros cinéticos de r_3 calculados por ajuste de los datos del experimento nº 4. en simple respuesta a diferentes ecuaciones cinéticas. Condiciones experimentales: T=34° C, $C_N=257$ p.p.m de amonio, N= variable (210 r.p.m. inicial).

Cinética	Valores de los parámetros			t Student		F Fischer		SRC
	Máx	Ópt	Mín	Obt.	Teor.	Obt.	Teor.	
$k_1 \cdot C_N$	$k_1=0,057$	$k_1=0,054$	$k_1=0,051$	$2,1 \cdot 10^3$	2,060	3078	4,35	1,4
$k_1 \cdot C_X \cdot C_N$	$k_1=0,629$	$k_1=0,629$	$k_1=0,629$	$3,3 \cdot 10^3$	2,060	3282	4,35	0,11
$k_1 \cdot C_X \cdot \frac{C_N}{C_N+K_1}$	$k_1=0,078$ $K_1=0,063$	$k_1=0,078$ $K_1=0,063$	$k_1=0,078$ $K_1=0,063$	$7,1 \cdot 10^3$	2,064	2241	3,52	0,12

Tabla 6.26.- Parámetros cinéticos de r_3 calculados por ajuste de los datos del experimento n° 5. en simple respuesta a diferentes ecuaciones cinéticas. Condiciones experimentales: $T=28^\circ \text{C}$, $C_N=65$ p.p.m de amonio, $N=$ variable (210 r.p.m. inicial).

Cinética	Valores de los parámetros			t Student		F Fischer		SRC
	Máx	Ópt	Mín	Obt.	Teor.	Obt.	Teor.	
$k_1 \cdot C_N$	$k_1=0.054$	$k_1=0.0544$	$k_1=0.054$	$2.1 \cdot 10^3$	2,11	3078	4,38	2.60
$k_1 \cdot C_X \cdot C_N$	$k_1=0.629$	$k_1=0.629$	$k_1=0.629$	$3.3 \cdot 10^3$	2,11	3282	4,38	0,25
$k_1 \cdot C_X \cdot \frac{C_N}{C_N+K_1}$	$k_1=0.078$ $K_1=0.063$	$k_1=0.078$ $K_1=0.063$	$k_1=0.078$ $K_1=0.063$	$7.1 \cdot 10^3$	2,12	2241	3,55	0.13

Tabla 6.27.- Parámetros cinéticos de r_3 calculados por ajuste de los datos del experimento n° 6. en simple respuesta a diferentes ecuaciones cinéticas. Condiciones experimentales: $T=28^\circ \text{C}$, $C_N=130$ p.p.m de amonio, $N=$ variable (210 r.p.m. inicial).

Cinética	Valores de los parámetros			t Student		F Fischer		SRC
	Máx	Ópt	Mín	Obt.	Teor.	Obt.	Teor.	
$k_1 \cdot C_N$	$k_1=0.067$	$k_1=0.066$	$k_1=0.065$	2.10^2	2,069	725	3,68	1,8
$k_1 \cdot C_X \cdot C_N$	$k_1=0.827$	$k_1=0.825$	$k_1=0.823$	3.10^3	2,069	1536	3,68	0,56
$k_1 \cdot C_X \cdot \frac{C_N}{C_N+K_1}$	$k_1=0.08$ $K_1=0.062$	$k_1=0.079$ $K_1=0.062$	$k_1=0.078$ $K_1=0.062$	$3.5 \cdot 10^3$	2,074	2325	3,34	0,43

Tabla 6.28.- Parámetros cinéticos de r_3 calculados por ajuste de los datos del experimento n° 7. en simple respuesta a diferentes ecuaciones cinéticas. Condiciones experimentales: $T=28^\circ \text{C}$, $C_N=475$ p.p.m de amonio, $N=$ variable (210 r.p.m. inicial).

Cinética	Valores de los parámetros			t Student		F Fischer		SRC
	Máx	Ópt	Mín	Obt.	Teor.	Obt.	Teor.	
$k_1 \cdot C_N$	$k_1=0.054$	$k_1=0.054$	$k_1=0.054$	$2.1 \cdot 10^3$	2,080	3078	4,30	3,4
$k_1 \cdot C_X \cdot C_N$	$k_1=0.629$	$k_1=0.629$	$k_1=0.629$	$3.3 \cdot 10^3$	2,080	3282	4,43	0,8
$k_1 \cdot C_X \cdot \frac{C_N}{C_N+K_1}$	$k_1=0.078$ $K_1=0.063$	$k_1=0.078$ $K_1=0.063$	$k_1=0.078$ $K_1=0.063$	$7.1 \cdot 10^3$	2,086	2241	32,37	0,5

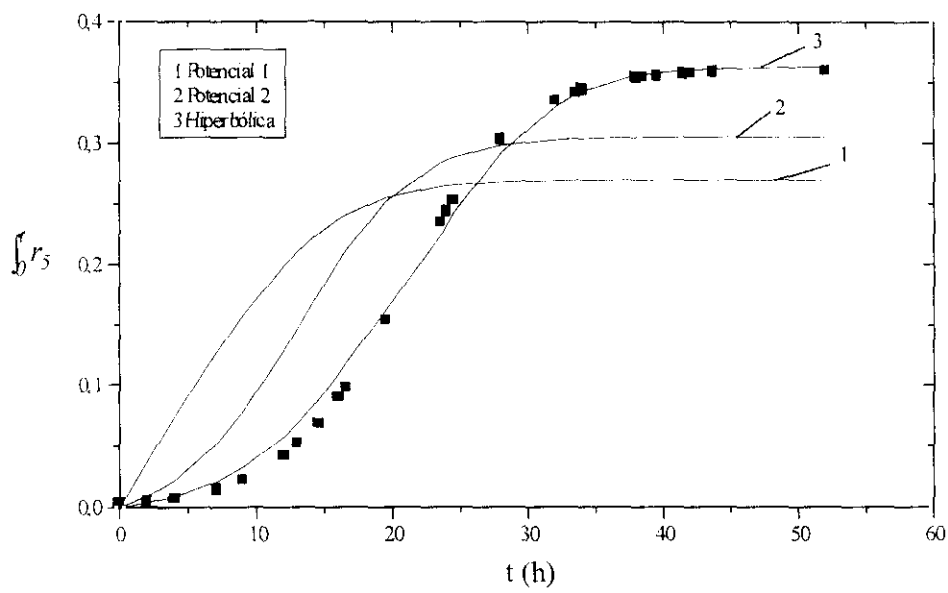


Figura 6.19.- Evolución mostrada por la integral de r_5 con el tiempo para el experimento n° 2, realizado a 28°C y 257 p.p.m. de amonio probando diferentes cinéticas y su comparación con la función correspondiente a proteínas.

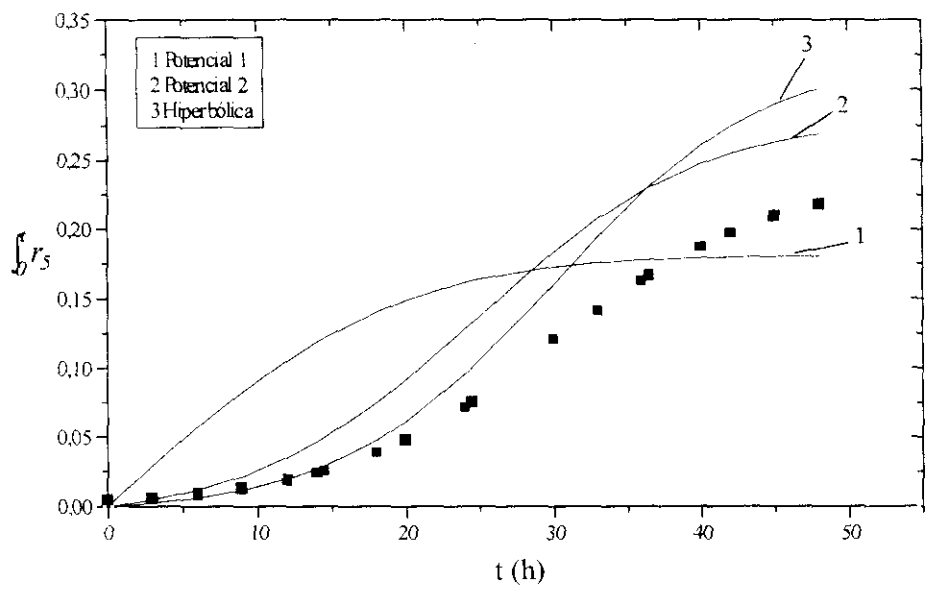


Figura 6.20.- Evolución mostrada por la integral de r_5 con el tiempo para el experimento n° 2, realizado a 34°C y 257 p.p.m. de amonio probando diferentes cinéticas y su comparación con la función correspondiente a proteínas.

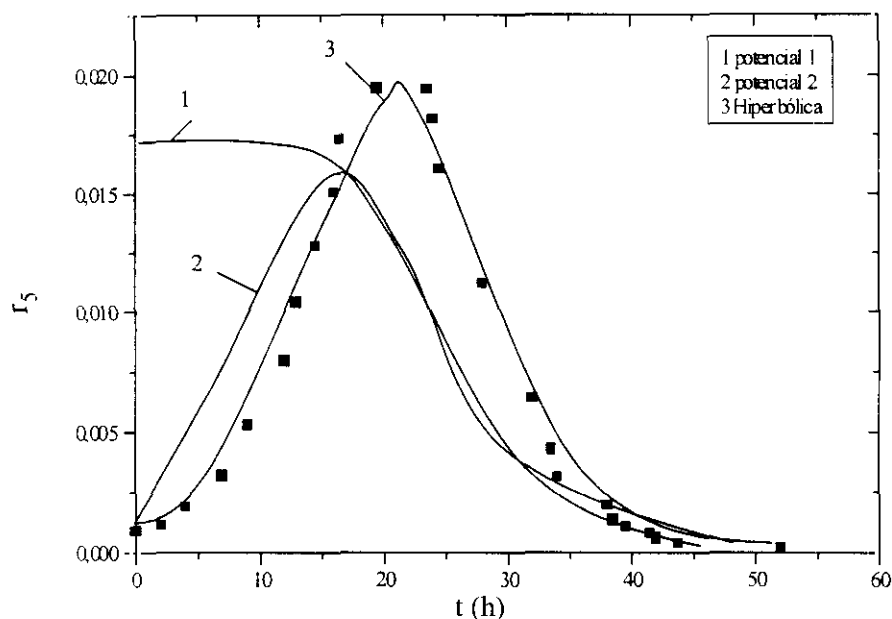


Figura 6.21.- Evolución mostrada por r_{55} con el tiempo para el **experimento n° 2**, realizado a **28°C** y **257 p.p.m. de amonio**, probando diferentes cinéticas y su comparación con la función correspondiente a proteínas.

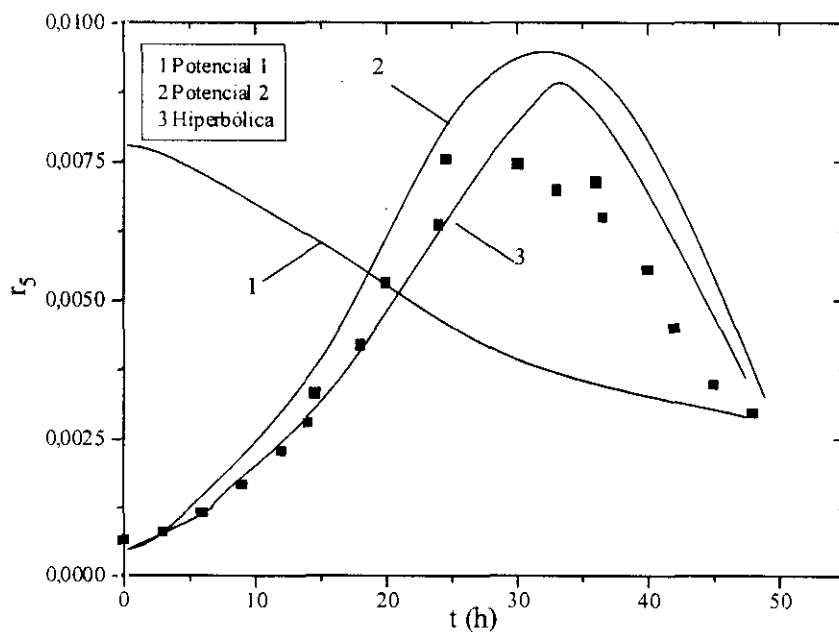


Figura 6.22.- Evolución mostrada por r_{55} con el tiempo para el **experimento n° 4**, realizado a **34°C** y **257 p.p.m. de amonio** probando diferentes cinéticas y su comparación con la función correspondiente a proteínas.

Los resultados obtenidos para la **reacción r_2 (para aminoácidos formadores de bases)**, - válido sólo para la simplificación 2, MCC-2-aplicando el método de las velocidades de reacción para determinar las cinéticas que pueden ser aplicadas en el modelo planteado, se muestran en las Tablas 6.29 a 6.35, donde se pueden observar los valores obtenidos para los parámetros de cada una de las funciones probadas, en este caso sólo potenciales, así como los valores estadísticos de dichos parámetros. Como puede apreciarse, la cinética que permite obtener mejor resultado es la potencial 1, es decir, la que viene en función sólo de la concentración de nitrógeno, pues como puede apreciarse en las tablas, en la cinética potencial 2, el valor del parámetro obtenido (k_2) para muchos de los experimentos incluye el cero en su intervalo de confianza y la suma de residuos al cuadrado tiene valores significativamente más altos en todos los experimentos, que los obtenidos con la ecuación cinética potencial 1.

Las Figuras 6.23 y 6.24 muestran las evoluciones de las curvas para la integral de la ecuación r_2 para los experimentos que se han tomado a modo de ejemplo (experimentos nº 2 (28°C, 257 p.p.m. de amonio) y nº 4 (34°C y 257 p.p.m.). Las Figuras 6.25 y 6.26, muestran estos mismos resultados para la ecuación correspondiente a r_2 , para los experimentos nº 2 y nº 4, respectivamente. En estas últimas figuras se puede apreciar la clara diferencia entre las dos cinéticas potenciales probadas para esta ecuación, siendo significativamente mejor la obtenida con la ecuación potencial 1.

Tabla 6.29.- Parámetros cinéticos de r_2 calculados por ajuste de los datos del experimento nº 1 en simple respuesta a diferentes ecuaciones cinéticas. Condiciones experimentales: **T=25° C, C_N =257 p.p.m de amonio, N= variable (210 r.p.m. inicial).**

Cinética	Valores de los parámetros			t Student		F Fischer		SRC
	Máx	Ópt	Mín	Obt.	Teor.	Obt.	Teor.	
$k_1 \cdot C_N$	$k_1=0,094$	$k_1=0,091$	$k_1=0,088$	1,1.10 ²	2,086	1221	2,2	0.5
$k_1 \cdot C_X \cdot C_N$	$k_1=0,580$	$k_1=0,250$	$k_1=-0,080$	42,1	2,086	825	3,25	1,7

Tabla 6.30.- Parámetros cinéticos de r_2 calculados por ajuste de los datos del experimento n° 2 en simple respuesta a diferentes ecuaciones cinéticas. Condiciones experimentales: $T=28^\circ\text{C}$, $C_N=257$ p.p.m de amonio, $N=$ variable (210 r.p.m. inicial).

Cinética	Valores de los parámetros			t Student		F Fischer		SRC
	Máx	Ópt	Mín	Obt.	Teor.	Obt.	Teor.	
$k_1 \cdot C_N$	$k_1=0,152$	$k_1=0,0168$	$k_1=0,148$	$3,1 \cdot 10^2$	2,074	1120	2,080	0,18
$k_1 \cdot C_X \cdot C_N$	$k_1=0,440$	$k_1=0,175$	$k_1=-0,090$	62,5	2,074	83,5	2,086	1,95

Tabla 6.31.- Parámetros cinéticos de r_2 calculados por ajuste de los datos del experimento n° 3 en simple respuesta a diferentes ecuaciones cinéticas. Condiciones experimentales: $T=31^\circ\text{C}$, $C_N=257$ p.p.m de amonio, $N=$ variable (210 r.p.m. inicial).

Cinética	Valores de los parámetros			t Student		F Fischer		SRC
	Máx	Ópt	Mín	Obt.	Teor.	Obt.	Teor.	
$k_1 \cdot C_N$	$k_1=0,277$	$k_1=0,192$	$k_1=0,107$	$2,1 \cdot 10^3$	2,080	2254	4,35	0,21
$k_1 \cdot C_X \cdot C_N$	$k_1=0,917$	$k_1=0,567$	$k_1=0,217$	$1,3 \cdot 10^2$	2,080	3225	4,35	1,25

Tabla 6.32.- Parámetros cinéticos de r_2 calculados por ajuste de los datos del experimento n° en simple respuesta a diferentes ecuaciones cinéticas. Condiciones experimentales: $T=34^\circ\text{C}$, $C_N=257$ p.p.m de amonio, $N=$ variable (210 r.p.m. inicial).

Cinética	Valores de los parámetros			t Student		F Fischer		SRC
	Máx	Ópt	Mín	Obt.	Teor.	Obt.	Teor.	
$k_1 \cdot C_N$	$k_1=0,061$	$k_1=0,055$	$k_1=0,048$	$1,1 \cdot 10^3$	2,060	1225	4,35	0,5
$k_1 \cdot C_X \cdot C_N$	$k_1=1,521$	$k_1=0,631$	$k_1=0,259$	35,2	2,060	3251	4,35	2,3

Tabla 6.33.- Parámetros cinéticos de r_2 calculados por ajuste de los datos del experimento n° 4 en simple respuesta a diferentes ecuaciones cinéticas. Condiciones experimentales: $T=28^\circ \text{C}$, $C_N=65 \text{ p.p.m}$ de amonio, $N= \text{variable}$ (210 r.p.m. inicial).

Cinética	Valores de los parámetros			t Student		F Fischer		SRC
	Máx	Ópt	Mín	Obt.	Teor.	Obt.	Teor.	
$k_1 \cdot C_N$	$k_1=0,560$	$k_1=0,350$	$k_1=0,140$	$1,1 \cdot 10^3$	2,11	552	4,38	0,2
$k_1 \cdot C_X \cdot C_N$	$k_1=2,140$	$k_1=1,250$	$k_1=0,350$	$8,3 \cdot 10^2$	2,11	875	4,38	7,2

Tabla 6.34.- Parámetros cinéticos de r_2 calculados por ajuste de los datos del experimento n° 6 en simple respuesta a diferentes ecuaciones cinéticas. Condiciones experimentales: $T=28^\circ \text{C}$, $C_N=130 \text{ p.p.m}$ de amonio, $N= \text{variable}$ (210 r.p.m. inicial).

Cinética	Valores de los parámetros			t Student		F Fischer		SRC
	Máx	Ópt	Mín	Obt.	Teor.	Obt.	Teor.	
$k_1 \cdot C_N$	$k_1=0,158$	$k_1=0,125$	$k_1=0,092$	$1,1 \cdot 10^3$	2,069	878	3,68	0,23
$k_1 \cdot C_X \cdot C_N$	$k_1=1,47$	$k_1=0,69$	$k_1=0,19$	25,3	2,069	325	3,68	3,5

Tabla 6.35.- Parámetros cinéticos de r_2 calculados por ajuste de los datos del experimento n° 7 en simple respuesta a diferentes ecuaciones cinéticas. Condiciones experimentales: $T=28^\circ \text{C}$, $C_N=475 \text{ p.p.m}$ de amonio, $N= \text{variable}$ (210 r.p.m. inicial).

Cinética	Valores de los parámetros			t Student		F Fischer		SRC
	Máx	Ópt	Mín	Obt.	Teor.	Obt.	Teor.	
$k_1 \cdot C_N$	$k_1=1,28$	$k_1=0,92$	$k_1=0,56$	$8,1 \cdot 10^2$	2,08	997	4,30	0,52
$k_1 \cdot C_X \cdot C_N$	$k_1=3,98$	$k_1=1,98$	$k_1=0,02$	83,5	2,08	755	4,30	2,5

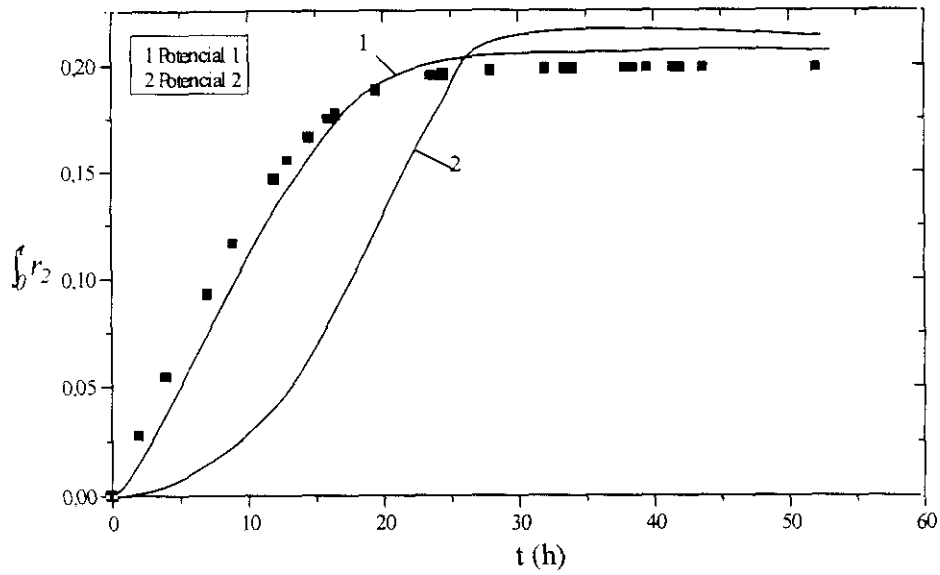


Figura 6.23.- Evolución mostrada por la **integral de r_2** con el tiempo para el **experimento n° 2**, realizado a **28°C** y **257 p.p.m.** de amonio probando diferentes cinéticas y su comparación con la función correspondiente a proteínas.

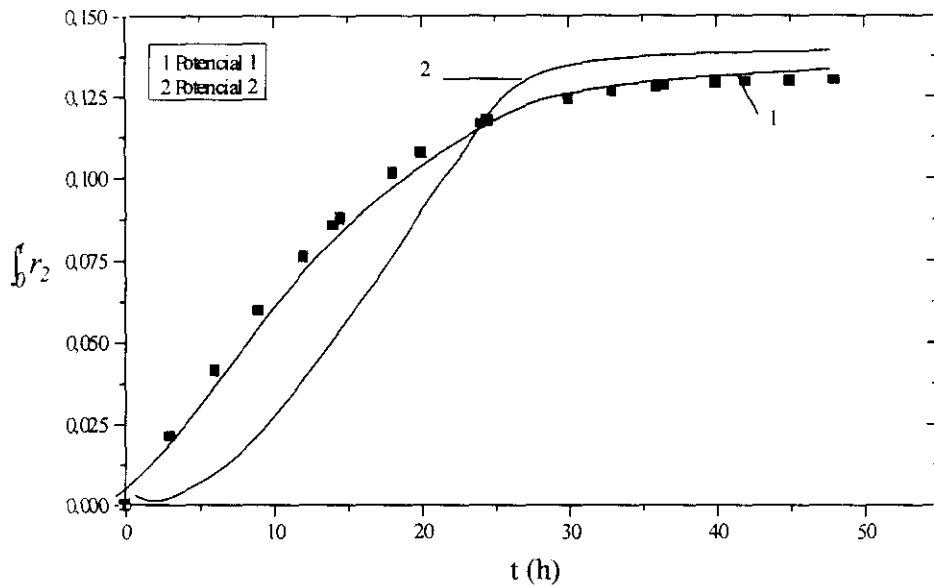


Figura 6.24.- Evolución mostrada por la **integral de r_2** con el tiempo para el **experimento n° 4**, realizado a **34°C** y **257 p.p.m.** de amonio probando diferentes cinéticas y su comparación con la función correspondiente a proteínas.

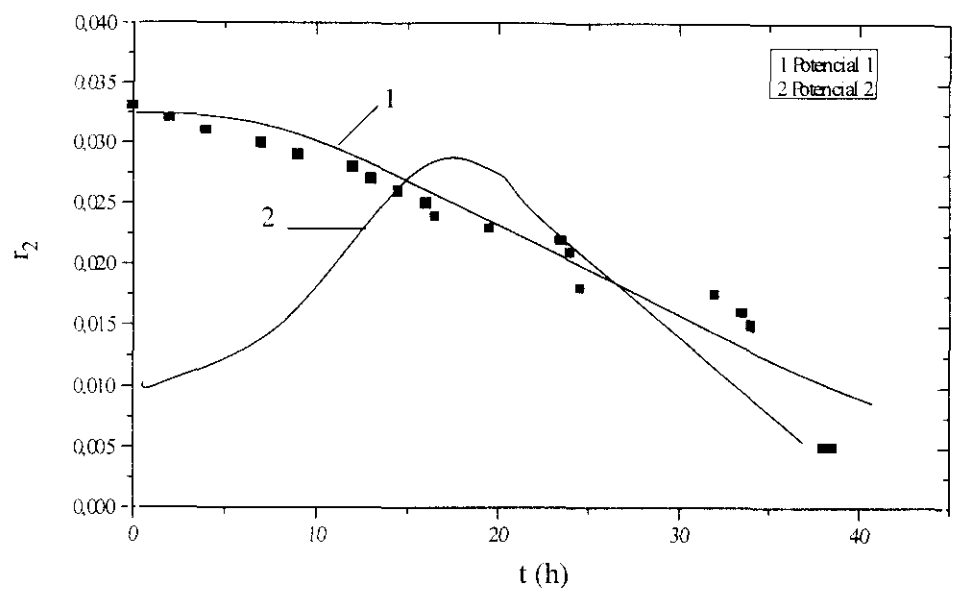


Figura 6.25.- Evolución mostrada por r_{S2} con el tiempo para el **experimento n° 2**, realizado a **28°C** y **257 p.p.m.** de amonio probando diferentes cinéticas y su comparación con la función correspondiente a proteínas.

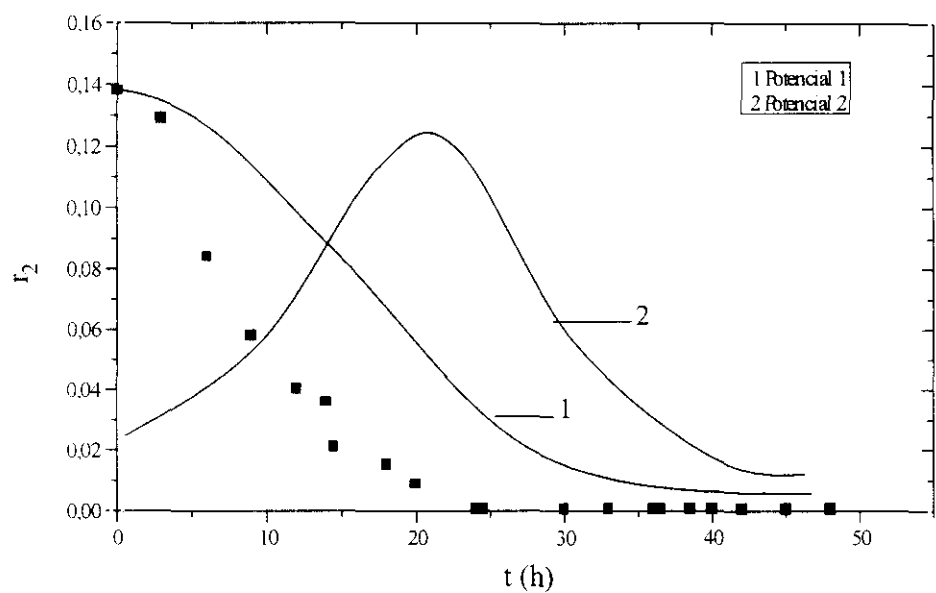


Figura 6.26.- Evolución mostrada por r_{S2} con el tiempo para el **experimento n° 4**, realizado a **34°C** y **257 p.p.m.** de amonio probando diferentes cinéticas y su comparación con la función correspondiente a proteínas.

De todo lo visto, se puede concluir que el método aplicado para obtener las velocidades de reacción del modelo de célula planteado permite discernir qué tipo de cinética se puede emplear para cada una de las reacciones del esquema elegido.

Se ha observado que las ecuaciones reacciones cinéticas r_1 , r_3 y r_5 (válidas tanto para el modelo MCC-1 como para el MCC-2), presentan mejores resultados con ecuaciones cinéticas de tipo hiperbólico (ecuación [6.38]) o tipo potencial 2 (ecuación [6.37]), no siendo posible discriminar mediante criterios estadísticos cuál de las dos ecuaciones puede ser la más adecuada para el modelo planteado. Por este tipo de criterio se ha desechado la ecuación potencial 1 (ecuación [6.36]) para estas reacciones pues, aunque cumplía las restricciones estadísticas impuestas para sus parámetros, presentaba valores de la t de Student y de la F de Fischer significativamente más bajos, y valores de suma de residuos al cuadrado (SRC) más altos, lo que indica un peor ajuste a la función con la que se realiza la comparación; esto último se veía corroborado a la vista de las formas de las curvas correspondientes para cada velocidad de reacción, donde la tendencia en el error es evidente. Quedó patente que con la cinética potencial 1 se obtenían curvas con forma descendente y no la curva sigmoidal que presentan estas funciones $f(C_j)$ para cinéticas tipo hiperbólico y potencial 2.

Para la reacción 2 (r_2), correspondiente a la velocidad de formación de aminoácidos no formadores de bases, sólo presente en la simplificación 2 (MCC-2), se ha mostrado que los resultados mejores han sido los obtenidos para la cinética potencial 1, presentándose valores estadísticos de los parámetros significativamente mejores que con la cinética potencial 2. En cuanto a la forma presentada por las curvas en comparación a la función, se observa claramente el mejor resultado de la ecuación potencial 1, tanto en las figuras en las que la aparece r_2 integrada como en las que aparece en diferencial, siendo más clara la diferencia en este último caso.

Se va a proceder ahora a realizar el ajuste en **múltiple respuesta**, empleando regresión no lineal para cada una de las simplificaciones (MCC-1 y MCC-2) y probando las cinéticas obtenidas en simple respuesta en este apartado, con el fin de continuar con la discriminación y llegar a obtener modelo cinético de célula más adecuado.

6.2.3- Obtención de Parámetros por Ajuste en Múltiple Respuesta

El ajuste de los datos experimentales al modelo cinético de célula ha sido realizado empleando regresión no lineal en múltiple-respuesta para cada una de las simplificaciones propuestas en el apartado anterior. Se va a probar cada una de las ecuaciones cinéticas para las velocidades de reacción que han resultado convenientes en el apartado anterior, y para las dos simplificaciones supuestas, esto es para MCC-1 y MCC-2.

- **Ajuste en Múltiple Respuesta para la Simplificación 1 (MCC-1)**

Las velocidades de producción de este modelo, como ya fue visto en apartados anteriores, vienen dadas por las expresiones indicadas en las ecuaciones de la [6.27] a la [6.30].

Las ecuaciones cinéticas a probar en primer lugar serán las de **tipo potencial 2**, de acuerdo a lo visto en el apartado anterior y vienen dadas por las siguientes expresiones:

$$r_1 = k_1 \cdot C_X \cdot C_N \quad [6.39]$$

$$r_3 = k_3 \cdot C_X \cdot C_N \quad [6.40]$$

$$r_5 = k_5 \cdot C_X \cdot C_N \quad [6.41]$$

El modelo MCC-1, considera 3 respuestas (RNA, DNA y proteína intracelular) y tres parámetros (k_1 , k_3 , k_5).

Los parámetros obtenidos, por ajuste al **MCC-1** con cinéticas dadas por las ecuaciones [6.39] a [6.41], para el experimento n° 1 realizado a **25°C** y **257 p.p.m.**, cumplen las restricciones estadísticas impuestas (Tabla 6.36), si bien presentan un valor de SRC (suma de residuos al cuadrado) relativamente alto, indicativo de que la reproducción de datos experimentales es poco aceptable, tal como puede comprobarse, a la vista de la evolución de componentes, en la Figura 6.27.

El ajuste del **experimento n° 2 (28°C y 257 p.p.m.)** al **MCC-1** permite la obtención de los parámetros que se indican en la Tabla 6.37. Los parámetros obtenidos por ajuste al **MCC-1** con las cinéticas potenciales, superan los valores teóricos de la *t* de Student y la *F*

de Fischer. El valor de la suma de residuos al cuadrado, indicativo de la calidad de la reproducción es también un valor elevado, lo cual es corroborado por la mala reproducción de los datos del experimento realizado en estas condiciones, tal como indica la Figura 6.28.

Los parámetros obtenidos para el **experimento n° 3** realizado a **31°C** y **257 p.p.m.**, de nuevo cumplen las restricciones estadísticas impuestas (Tabla 6.38), pero la reproducción de los datos experimentales (Figura 6.29) no es buena.

Para el experimento realizado a **34°C** y **257 p.p.m.** de amonio inicial (**experimento n° 4**), los valores físicos y estadísticos de los parámetros se muestran en la Tabla 6.39, donde se aprecia que se cumplen las condiciones estadísticas teóricas, y en la Figura 6.30 muestra, a diferencia de los experimentos anteriores una buena reproducción

El ajuste realizado al **MCC-1** con cinéticas potenciales para el **experimento n° 5** realizado a **28°C** y **65 p.p.m.**, muestra que los parámetros obtenidos cumplen las restricciones estadísticas impuestas (Tabla 6.40), si bien el valor de SRC (suma de residuos al cuadrado) es significativamente elevado, por lo que no se obtiene una buena reproducción de los datos experimentales, tal como muestra la Figura 6.31.

Para el **experimento n° 6**, realizado a **28°C** y **130 p.p.m.**, los parámetros obtenidos cumplen las condiciones estadísticas, como se muestra en la Tabla 6.41, en cambio, es incapaz de reproducir de forma adecuada los datos experimentales obtenidos, tal como muestra la Figura 6.32.

Los parámetros obtenidos por ajuste al **MCC-1** con cinéticas potenciales para el **experimento n° 7** realizado a **28°C** y **475 p.p.m.**, también cumplen las restricciones estadísticas impuestas (Tabla 6.42) pero no permiten una buena reproducción de los datos experimentales, tal como muestra la Figura 6.33.

Tabla 6.36.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del experimento nº 1. Condiciones experimentales: T=25° C, C_N=257 p.p.m de amonio, N= variable (210 r.p.m. inicial), al modelo MCC-1.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k ₁	0,129	0,129	0,129	1,1.10 ³	377,2
k ₃	0,169	0,149	0,129	7,1.10 ³	
k ₅	0,714	0,706	0,697	2,3.10 ²	
t de Student (95% confianza)= 2,080 F de Fischer (95% de confianza)= 2,49			SRC= 4,3		

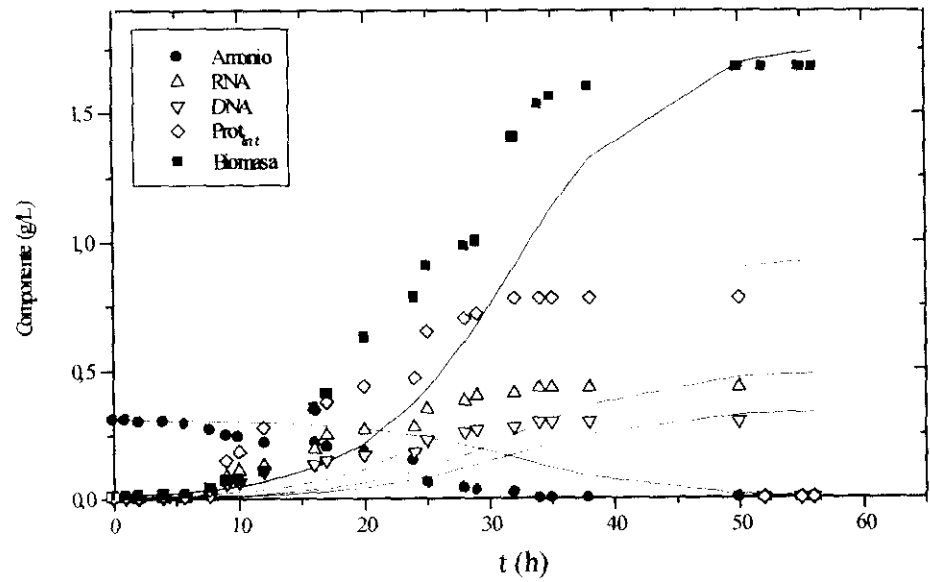


Figura 6.27.- Evoluciones de los componentes del sistema obtenidos por ajuste del experimento nº 1 (25°C y 257 p.p.m. de amonio inicial) al modelo MCC-1.

Tabla 6.37.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del experimento nº 2. Condiciones experimentales: $T=28^{\circ}\text{C}$, $C_N=257$ p.p.m de amonio, $N=$ variable (210 r.p.m. inicial), al modelo MCC-1.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k ₁	0,074	0,0636	0,052	3,1.10 ²	134,5
k ₃	0,0931	0,0931	0,0931	1,9.10 ²	
k ₅		0,229		2,3.10 ²	
t de Student (95% confianza)= 2,080 F de Fischer (95% de confianza)= 2,49			SRC= 8,6		

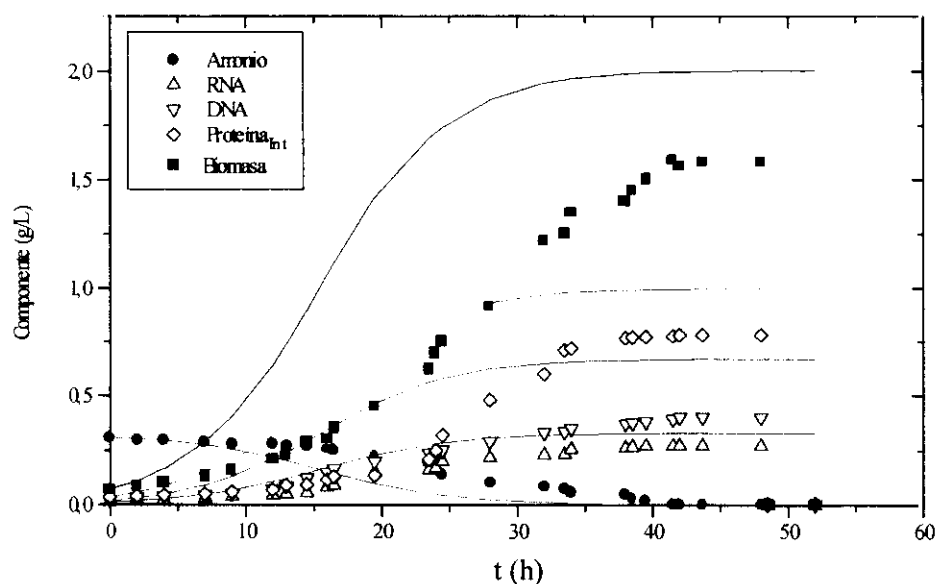


Figura 6.28.- Evoluciones de los componentes del sistema obtenidos por ajuste del experimento nº 2 (28°C y 257 p.p.m. de amonio inicial) al modelo MCC-1.

Tabla 6.38.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del experimento nº 3. Condiciones experimentales: T=31° C, C_N=257 p.p.m de amonio, N= variable (210 r.p.m. inicial), al modelo MCC-1.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k ₁	0,098	0,088	0,078	1,1.10 ²	573,25
k ₃	0,014	0,012	0,010	5,1.10 ³	
k ₅	0,317	0,315	0,313	1,3.10 ³	
t de Student (95% confianza)= 2,080 F de Fischer (95% de confianza)= 2,49			SRC= 1,05		

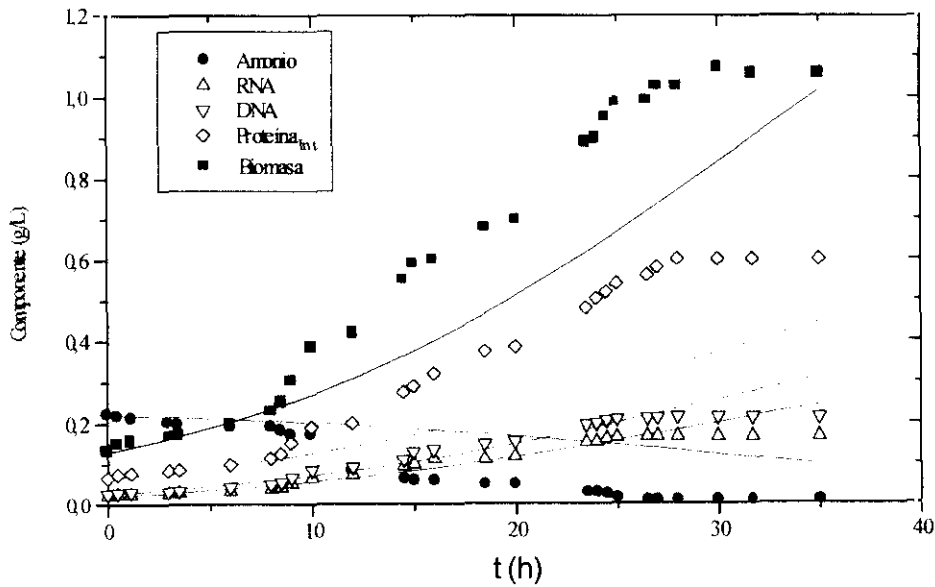


Figura 6.29.- Evoluciones de los componente del sistema obtenidos por ajuste del experimento nº 3 (31°C y 257 p.p.m. de amonio inicial) al modelo MCC-1.

Tabla 6.39.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del experimento n° 4. Condiciones experimentales: $T=34^{\circ}\text{C}$, $C_N=257$ p.p.m de amonio, $N=$ variable (210 r.p.m. inicial), al modelo MCC-1.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k ₁	0,226	0,176	0,126	3,1.10 ³	361,5
k ₃	0,255	0,247	0,239	7,1.10 ⁴	
k ₅	0,0759	0,0759	0,0759	2,3.10 ⁵	
t de Student (95% confianza)= 2,080 F de Fischer (95% de confianza)= 2,49			SRC= 0,85		

t de Student (95% confianza)= 2,080

F de Fischer (95% de confianza)= 2,49

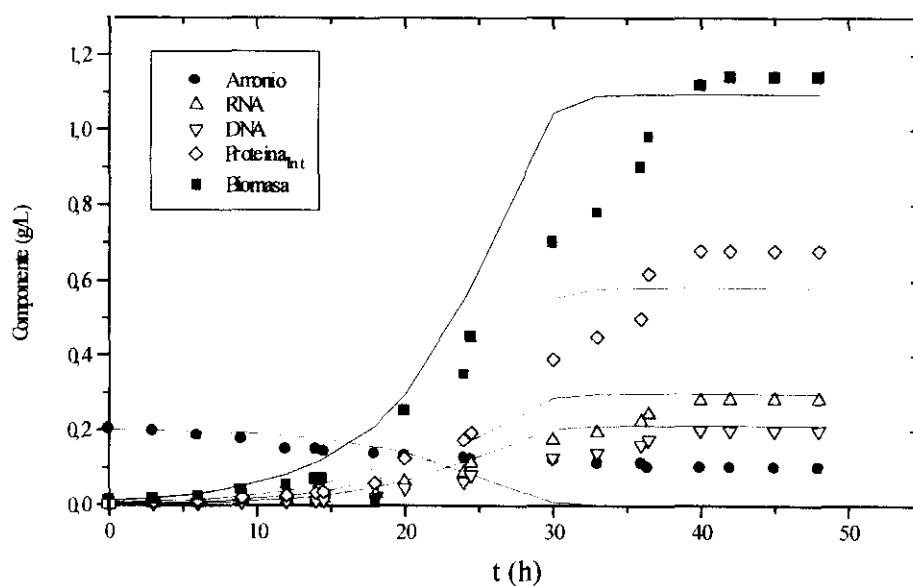


Figura 6.30.- Evoluciones de los componente del sistema obtenidos por ajuste del experimento n° 4 (34°C y 257 p.p.m. de amonio inicial) al modelo MCC-1.

Tabla 6.40.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del experimento nº 5. Condiciones experimentales: T=28° C, C_N=65 p.p.m de amonio, N= variable (210 r.p.m. inicial), al modelo MCC-1.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k ₁	0,580	0,577	0,574	3,1.10 ³	92,33
k ₃	0,818	0,804	0,790	7,1.10 ³	
k ₅	1,375	1,375	1,375	2,3.10 ²	
t de Student (95% confianza)= 2,080 F de Fischer (95% de confianza)= 2,49			SRC= 4,11		

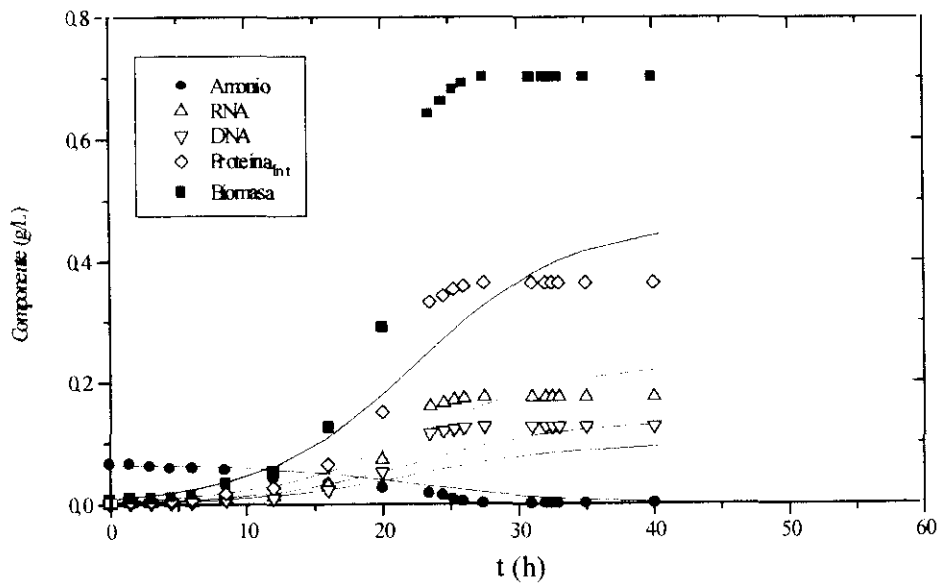


Figura 6.31.- Evoluciones de los componente del sistema obtenidos por ajuste del experimento nº 5 (28 °C y 65 p.p.m. de amonio inicial) al modelo MCC-1.

Tabla 6.41.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del **experimento n° 6**. Condiciones experimentales: $T=28^{\circ}\text{C}$, $C_N=130$ p.p.m de amonio, $N=$ variable (210 r.p.m. inicial), al modelo MCC-1.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k ₁	0,286	0,23	0,174	8,1.10 ³	723,75
k ₃	0,326	0,324	0,322	2,1.10 ⁴	
k ₅	0,761	0,761	0,761	5,9.10 ⁴	
t de Student (95% confianza)= 2,080 F de Fischer (95% de confianza)= 2,49			SRC= 0,92		

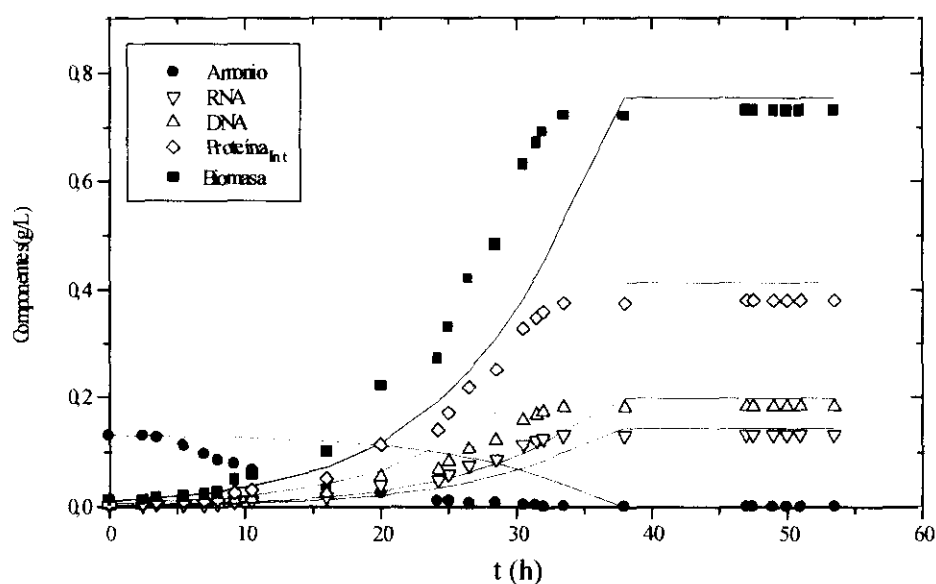


Figura 6.32.- Evoluciones de los componente del sistema obtenidos por ajuste del **experimento n° 6** (28°C y 130 p.p.m. de amonio inicial) al modelo MCC-1.

Tabla 6.42.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del experimento nº 7. Condiciones experimentales: T=28° C, C_N=475 p.p.m de amonio, N= variable (210 r.p.m. inicial), al modelo MCC-1.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k ₁	0,052	0,0414	0,030	1,1.10 ²	382,15
k ₃	0,057	0,054	0,051	7,1.10 ³	
k ₅	0,294	0,294	0,294	1,9.10 ³	
t de Student (95% confianza)= 2,080 F de Fischer (95% de confianza)= 2,49			SRC= 0,62		

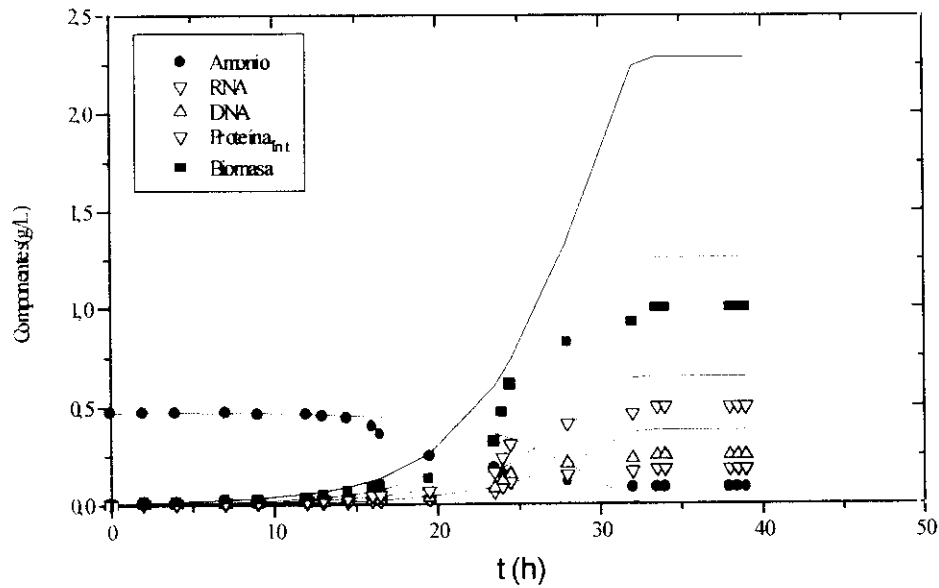


Figura 6.33.- Evoluciones de los componente del sistema obtenidos por ajuste del experimento nº 7 (28 °C y 475 p.p.m. de amonio inicial) al modelo MCC-1.

De todo lo visto en este apartado, podemos concluir que, en vista de los resultados obtenidos con MCC-1 en múltiple respuesta, no se ha conseguido un buen resultado en el ajuste de los datos de los experimentos realizados, si bien hay algún experimento (experimento n° 5), donde se ve una buena reproducción de las evoluciones de los componentes del sistema.

Aunque en todos los casos se superan los valores teóricos de la *t* de Student y de la *F* de Fischer, en casi todos los ajustes el valor de SRC (suma de residuos al cuadrado) ha sido significativamente elevado, lo cual indica la mala calidad de la reproducción de los datos experimentales con el MCC-1.

Como ya se vió en apartados anteriores, los criterios estadísticos pueden suponer una forma de discriminar entre modelos. Por lo que se puede descartar el modelo MCC-1, de acuerdo a este criterio.

A pesar de que los resultados estadísticos del ajuste de las reacciones individuales al aplicar simple respuesta eran indicativos de que el MCC-1 era un modelo, en principio, adecuado para la descripción del sistema, no es así cuando se aplica esta suposición en múltiple respuesta, por lo que, en adelante ya no se considerará esta simplificación y se tendrá en cuenta sólo la simplificación 2 (MMC-2), que, como se verá, es la que mejor resultado permite obtener para la reproducción de los datos experimentales del crecimiento de *Xanthomonas campestris*.

• Ajuste en Múltiple Respuesta para la Simplificación 2 (MCC-2)

Las velocidades de producción de este modelo, como ya fue visto en apartados anteriores, vienen dadas por las expresiones indicadas en las ecuaciones [6.26] para el amonio, [6.28] para el RNA, [6.29] para el DNA y [6.30] para las proteínas intracelulares.

El modelo MCC-2 considera 4 respuestas (RNA, DNA, proteína intracelular y amonio), pero el número de parámetros depende de la cinética que se pruebe para cada reacción, pues se pueden considerar ecuaciones cinéticas hiperbólicas en algunas de las reacciones del modelo (2 parámetros) y cinéticas potenciales (1 parámetro).

Como ya se ha comentado –y se va a exponer a continuación– el modelo MCC-2 es el que mejor resultado estadístico proporciona, pero se debe llegar a la discriminación entre los modelos cinéticos generados al tener en cuenta diferentes ecuaciones cinéticas, mediante alguno de los criterios comentados anteriormente.

Ya se mostró que la ecuación cinética correspondiente a la velocidad de aminoácidos formadores de bases, r_2 , respondía a una cinética potencial 1, mientras que la velocidad de reacción para aminoácidos no formadores de bases (r_1), y las velocidades correspondientes a la formación de RNA (r_3) y de formación de DNA (r_5), podrían responder tanto a cinéticas hiperbólicas como potenciales del tipo que denominamos potencial 2.

De la combinación de estas cinéticas, en las reacciones r_1 , r_3 y r_5 , se pueden considerar, teniendo en cuenta la simplificación 2, cuatro modelos:

- **MCC-3**, supone r_1 , r_3 , r_5 como ecuaciones potenciales 2 y r_2 potencial 1.
- **MCC-4** supone r_1 , r_3 , r_5 como ecuaciones hiperbólicas y r_2 potencial 1.
- **MCC-5** supone para r_1 cinética potencial 2; para r_3 , r_5 cinéticas hiperbólicas y r_2 potencial 1.
- **MCC-6** supone para r_1 cinética hiperbólica; para r_3 , r_5 cinéticas potenciales 2 y r_2 potencial 1.

• MCC-3

En este caso, el modelo MCC-3, se consideran 4 respuestas y 4 parámetros. El ajuste es realizado empleando regresión no lineal en múltiple respuesta de la forma ya indicada. Los resultados del ajuste a este modelo se muestran a continuación.

Los parámetros físicos y estadísticos obtenidos por ajuste al MCC-3, para el **experimento n°1 (25°C y 257 p.p.m. de amonio)**, se muestran en la Tabla 6.43, donde se puede observar que se superan los valores teóricos de la t de Student y F de la Fischer con un 95% de confianza. Además, en la Figura 6.34 se representan las evoluciones de los componentes del sistema, tanto los valores teóricos como los reproducidos por el MCC-3, pudiendo apreciarse el buen ajuste entre ambos.

El ajuste del **experimento n° 2 (28°C y 257 p.p.m.)** al MCC-3 permite la obtención de los parámetros que se indican en la Tabla 6.44. Los parámetros obtenidos por ajuste al

modelo superan los valores teóricos de la *t* de Student y la *F* de Fischer reproduciendo de forma adecuada los datos del experimento realizado en estas condiciones, tal como indica la Figura 6.35.

Los parámetros obtenidos para el **experimento n° 3** realizado a **31°C y 257 p.p.m.**, también cumplen las restricciones estadísticas impuestas (Tabla 6.45), permitiendo, de nuevo, una buena reproducción de los datos experimentales, como muestra la Figura 6.36.

Para el experimento realizado a **34°C y 257 p.p.m.** de amonio inicial (**experimento n° 4**), los valores físicos y estadísticos de los parámetros se muestran en la Tabla 6.46, donde se aprecia que los valores teóricos de *t* de Student y *F* de Fischer son superados en todos los casos, y la Figura 6.37 muestra la buena reproducción de los datos experimentales obtenidos para este experimento con el MCC-3.

El ajuste de los datos experimentales al MCC-3 con las cinéticas probadas en este caso para el **experimento n° 5** realizado a **28°C y 65 p.p.m.**, muestra que los parámetros obtenidos cumplen las restricciones estadísticas impuestas (Tabla 6.47) pero no se consigue una buena reproducción de los datos experimentales, tal como muestra la Figura 6.38, probablemente debido a que, en este experimento, la estequiometría supuesta no debe ser cierta en este caso.

El ajuste del **experimento n° 6**, realizado a **28°C y 130 p.p.m.**, muestra que los parámetros obtenidos cumplen las condiciones estadísticas teóricas, como se muestra en la Tabla 6.48, y reproduce de forma adecuada la evolución de los componentes del sistema con el MCC-3, tal como indica la Figura 6.39.

Los parámetros obtenidos por ajuste al MCC-3 para el **experimento n° 7** realizado a **28°C y 475 p.p.m.**, de nuevo cumplen las restricciones estadísticas impuestas (Tabla 6.49); la reproducción de los datos es aceptable, como indica la Figura 6.40, si bien es significativamente peor que la obtenida en el resto de experimentos, con los que se ha logrado reproducir perfectamente la evolución de cada uno de los componentes. Esto podría ser debido a que la concentración de amonio es tan elevada que podría estar produciendo un cierto efecto tóxico en las células, por lo que existiría una cierta inhibición del crecimiento del microorganismo.

Tabla 6.43.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del **experimento n° 1**.
Condiciones experimentales: **T=25° C**, **C_N=257 p.p.m** de amonio, **N= variable (210 r.p.m. inicial)**, al modelo **MCC-3**.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máy	Ópt	Mín		
k ₁	0,577	0,547	0,517	2,2.10 ⁴	1823,1
k ₃	0,162	0,151	0,140	1,1.10 ³	
k ₅	0,234	0,225	0,216	1,2.10 ³	
k ₂	0,040	0,035	0,030	3,2.10 ³	
t de Student (95% confianza)= 2,080 F de Fischer (95% de confianza)= 2,49			SRC= 0,088		

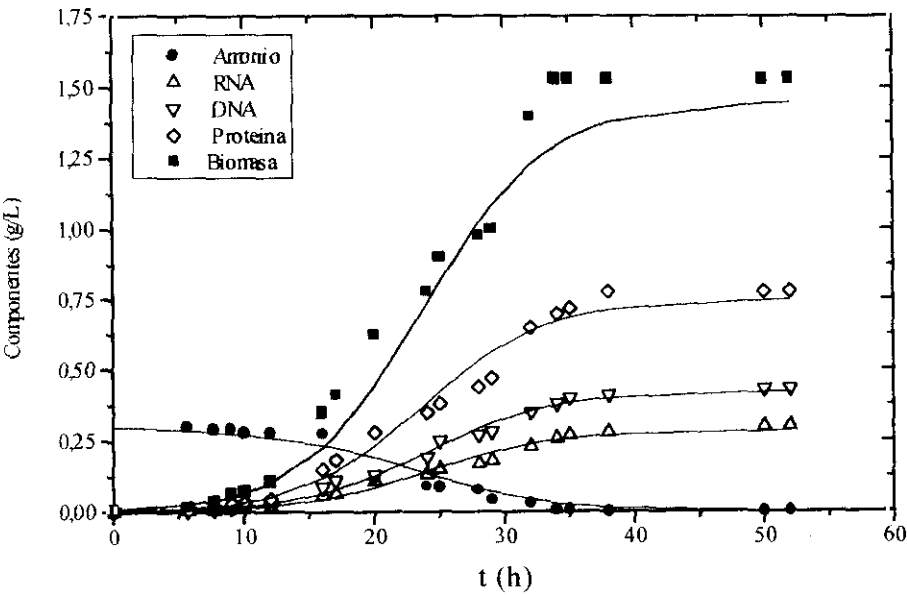


Figura 6.34.- Evoluciones de los componentes del sistema obtenidos por ajuste del **experimento n° 1 (25 °C y 257 p.p.m. de amonio inicial)** al modelo **MCC-3**.

Tabla 6.44.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del **experimento n° 2**.
Condiciones experimentales: $T=28^{\circ}\text{C}$, $C_N=257$ p.p.m de amonio, $N=$ variable (210 r.p.m. inicial), al modelo MCC-3.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k_1	0,573	0,57	0,567	$5,2 \cdot 10^3$	2725,1
k_3	0,155	0,152	0,149	$4,1 \cdot 10^4$	
k_5	0,200	0,199	0,197	$2,2 \cdot 10^4$	
k_2	0,040	0,038	0,036	$8,2 \cdot 10^3$	
t de Student (95% confianza)= 2,080 F de Fischer (95% de confianza)= 2,49			SRC= 0,060		

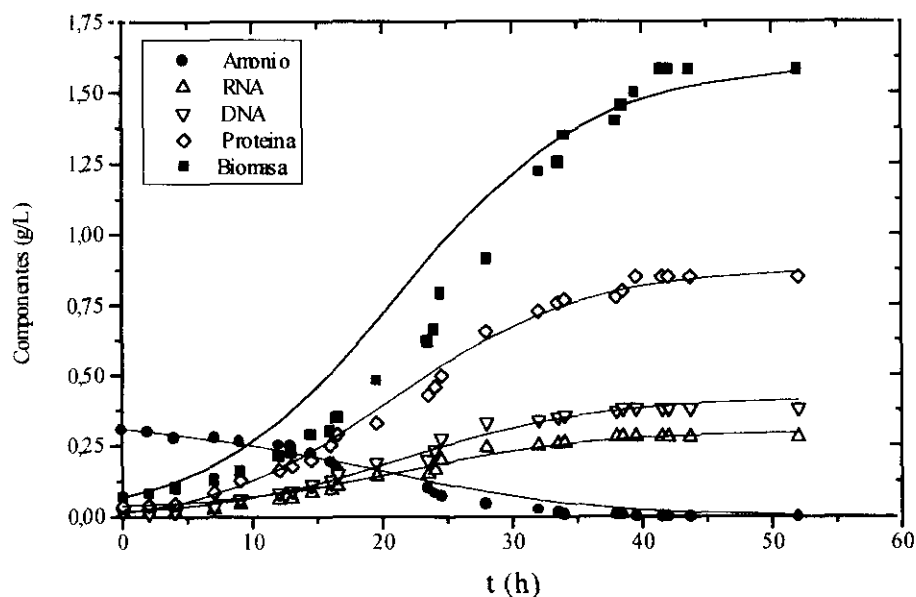


Figura 6.35.- Evoluciones de los componentes del sistema obtenidos por ajuste del **experimento n° 2** (28°C y 257 p.p.m. de amonio inicial) al modelo MCC-3.

Tabla 6.45.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del experimento nº 3. Condiciones experimentales: T=31° C, C_N=257 p.p.m de amonio, N= variable (210 r.p.m. inicial), al modelo MCC-3.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k ₁	0,378	0,375	0,371	3,2.10 ³	3825,1
k ₃	0,104	0,103	0,102	3,1.10 ³	
k ₅	0,148	0,147	0,146	1,2.10 ³	
k ₂	0,054	0,052	0,050	5,2.10 ³	
t de Student (95% confianza)= 2,080			SRC= 0,008		
F de Fischer (95% de confianza)= 2,49					

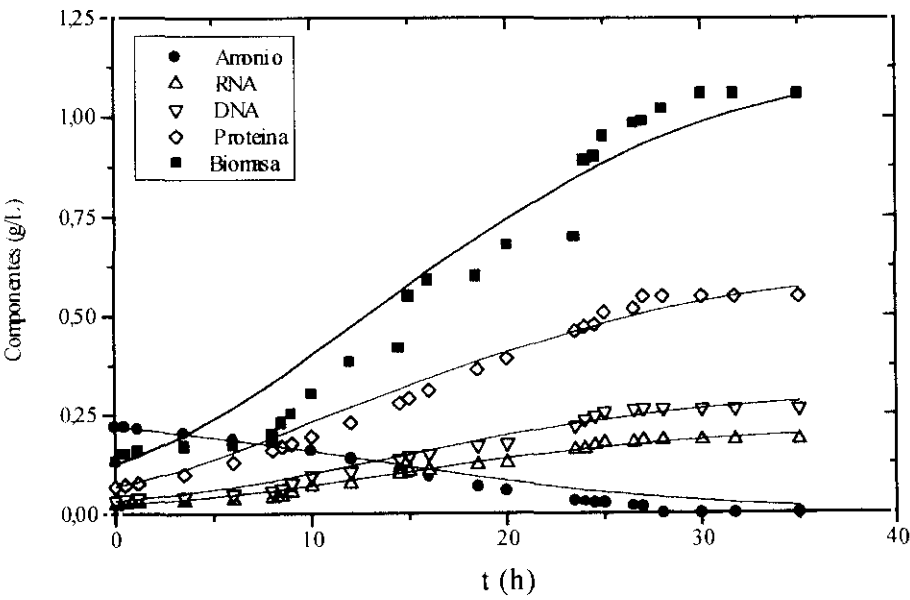


Figura 6.36.- Evoluciones de los componentes del sistema obtenidos por ajuste del experimento nº 3 (31 °C y 257 p.p.m. de amonio inicial) al modelo MCC-3.

Tabla 6.46.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del **experimento n° 4**. Condiciones experimentales: $T=34^{\circ}\text{C}$, $C_N=257$ p.p.m de amonio, $N=\text{variable}$ (210 r.p.m. inicial), al modelo MCC-3.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k ₁	0,229	0,221	0,213	2,2.10 ³	3895,1
k ₃	0,083	0,082	0,081	5,1.10 ⁴	
k ₅	0,112	0,112	0,112	8,2.10 ⁴	
k ₂	0,024	0,022	0,020	7,2.10 ³	
t de Student (95% confianza)= 2,080 F de Fischer (95% de confianza)= 2,49			SRC= 0,031		

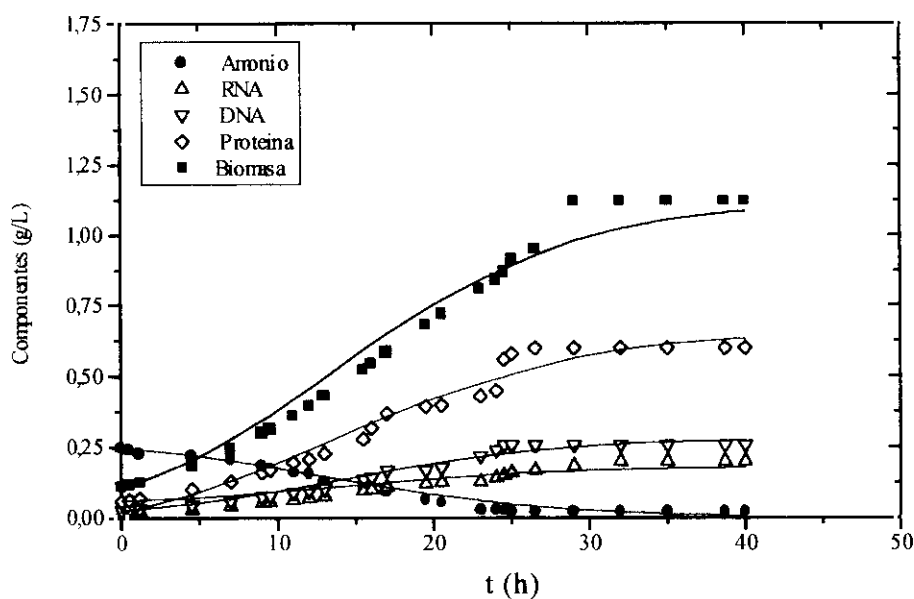


Figura 6.37.- Evoluciones de los componentes del sistema obtenidos por ajuste del **experimento n° 4** (34°C y 257 p.p.m. de amonio inicial) al modelo MCC-3.

Tabla 6.47.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del experimento n° 5. Condiciones experimentales: T=28° C, C_N=65 p.p.m de amonio, N= variable (210 r.p.m. inicial), al modelo MCC-3.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k ₁	0,614	0,610	0,606	2,2.10 ³	325,1
k ₃	0,185	0,182	0,178	5,1.10 ³	
k ₅	0,206	0,202	0,198	3,2.10 ³	
k ₂	0,066	0,065	0,064	7,2.10 ³	
t de Student (95% confianza)= 2,080 F de Fischer (95% de confianza)= 2,49			SRC= 1,89		

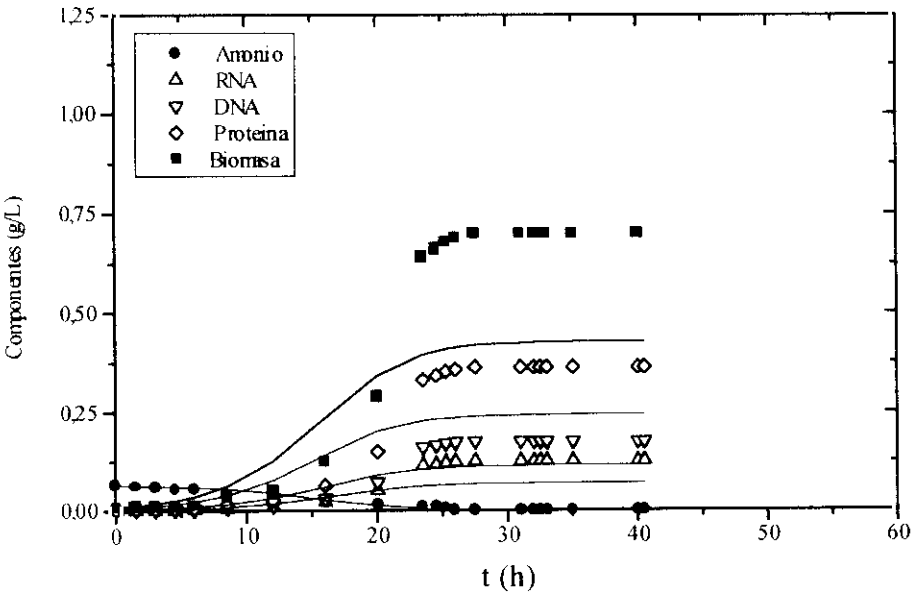


Figura 6.38.- Evoluciones de los componentes del sistema obtenidos por ajuste del experimento n° 5 (28 °C y 65 p.p.m. de amonio inicial) al modelo MCC-3.

Tabla 6.48.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del **experimento n° 6**.
Condiciones experimentales: $T=28^{\circ}\text{C}$, $C_N=130$ p.p.m de amonio, $N=$ variable (210 r.p.m. inicial), al modelo MCC-3.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k ₁	0,591	0,571	0,551	2,2.10 ³	986,2
k ₃	0,141	0,141	0,141	1,1.10 ⁴	
k ₅	0,195	0,195	0,195	1,2.10 ⁴	
k ₂	0,042	0,039	0,035	3,2.10 ²	
t de Student (95% confianza)= 2,080 F de Fischer (95% de confianza)= 2,49			SRC= 0,75		

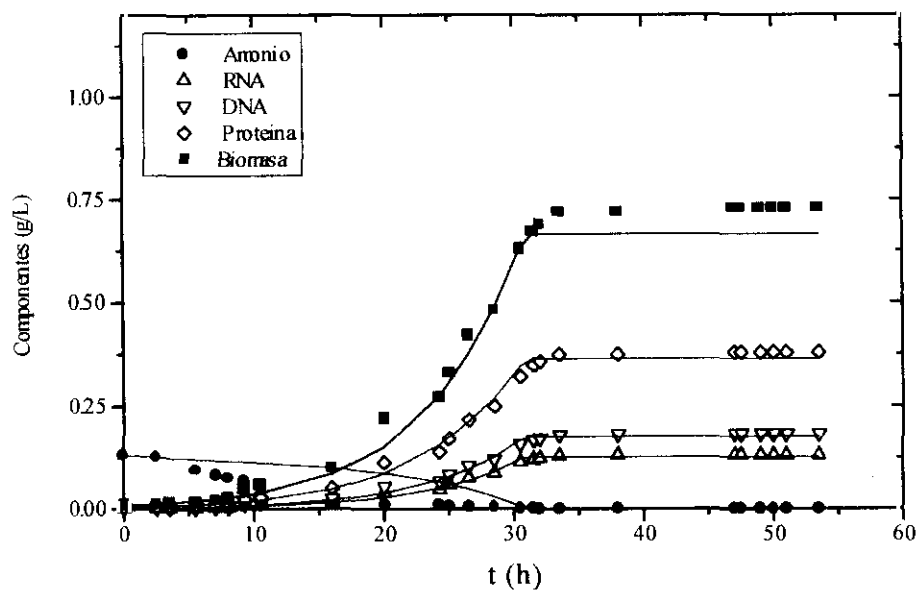


Figura 6.30.- Evoluciones de los componentes del sistema obtenidos por ajuste del **experimento n° 6** (28°C y 130 p.p.m. de amonio inicial) al modelo MCC-3.

Tabla 6.49.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del experimento nº 7. Condiciones experimentales: T=28° C, C_N=475 p.p.m de amonio, N= variable (210 r.p.m. inicial), al modelo MCC-3.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k ₁	0,613	0,610	0,607	2,2.10 ²	295,1
k ₃	0,184	0,182	0,180	5,1.10 ³	
k ₅	0,212	0,202	0,192	3,2.10 ³	
k ₂	0,067	0,065	0,062	7.2.10 ³	
t de Student (95% confianza)= 2,080 F de Fischer (95% de confianza)= 2,49			SRC= 0,75		

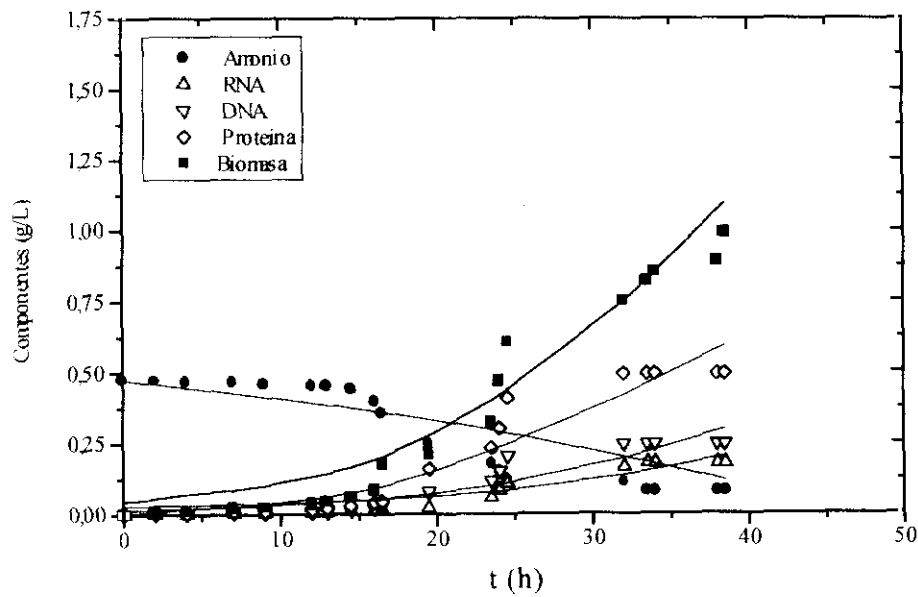


Figura 6.40.- Evoluciones de los componentes del sistema obtenidos por ajuste del experimento nº 7 (28 °C y 475 p.p.m. de amonio inicial) al modelo MCC-3.

• MCC-4

En este caso, el modelo considera 4 respuestas y 7 parámetros, debido a las cinéticas supuestas en cada velocidad reacción, es decir las reacciones r_1 , r_3 y r_5 , que se consideran hiperbólicas, mientras que la r_2 se considera potencial 1, como en los modelos anteriores.

El ajuste es realizado empleando regresión no lineal en múltiple respuesta. Los resultados del ajuste a este modelo (MCC-4) se muestran a continuación.

El ajuste del **experimento n° 1 (25°C y 257 p.p.m.)** al MCC-4 permite la obtención de los parámetros que se indican en la Tabla 6.50. Los parámetros obtenidos por ajuste al modelo superan los valores teóricos de la t de Student y la F de Fischer reproduciendo de forma adecuada los datos del experimento realizado en estas condiciones, tal como indica la Figura 6.41.

Los parámetros físicos y estadísticos, obtenidos por ajuste al MCC-4 para el **experimento n° 2 (28°C y 257 p.p.m. de amonio)**, se muestran en la Tabla 6.51, donde se puede observar que se superan los valores teóricos de t la Student y de la F de Fischer con un 95% de confianza. Además en la Figura 6.42 se representan las evoluciones de los componentes del sistema, tanto los valores teóricos como los reproducidos por el MCC-4, mostrándose el buen ajuste entre ambos.

Para el experimento realizado a 31°C y 257 p.p.m. de amonio inicial (**experimento n° 3**), los valores físicos y estadísticos de los parámetros se muestran en la Tabla 6.52, donde se aprecia que los valores teóricos de t de Student y F de Fischer son superados en todos los casos, y la Figura 6.43 muestra la buena reproducción de los datos experimentales obtenidos para este experimento con el MCC-4.

Los parámetros obtenidos para el **experimento n° 4** realizado a 34°C y 257 p.p.m., cumplen las restricciones estadísticas impuestas (Tabla 6.53), permitiendo, también una buena reproducción de los datos experimentales, como muestra la Figura 6.44.

Los parámetros obtenidos por ajuste al **MCC-4** con las cinéticas probadas en este caso para el **experimento n° 5** realizado a **28°C** y **65 p.p.m.**, también cumplen las restricciones estadísticas impuestas (Tabla 6.54) pero no permiten una buena reproducción de los datos experimentales, tal como ocurría con el modelo anterior a éste, y se muestra en la Figura 6.45.

Para el **experimento n° 6**, realizado a **28°C** y **130 p.p.m.**, los parámetros obtenidos cumplen las condiciones estadísticas teóricas, como se puede ver en la Tabla 6.55, y reproduce de forma adecuada la evolución de los componentes del sistema con el MCC-4, tal como indica la Figura 6.46.

Los parámetros obtenidos por ajuste al MCC-4 para el **experimento n° 7**, realizado a **28°C** y **475 p.p.m.**, cumplen las restricciones estadísticas impuestas (Tabla 6.56) y la reproducción de datos es aceptable (Figura 6.47), como ocurría en el caso anterior, pero peor que si se compara con el resto de los experimentos, lo que parece confirmar el efecto tóxico del amonio a elevadas concentraciones, antes comentado.

Tabla 6.50.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del experimento n° 1. Condiciones experimentales: $T=25^{\circ}\text{C}$, $C_N=257$ p.p.m de amonio, $N=$ variable (210 r.p.m. inicial), al modelo MCC-4.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k ₁	-	0,11	-	3,1.10 ³	2225,3
K ₁	0,005	0,005	0,005	7,8.10 ⁴	
k ₃	0,045	0,044	0,043	7,1.10 ³	
K ₃	0,049	0,048	0,047	6,2.10 ³	
k ₅	-	0,076	-	2,3.10 ⁴	
K ₅	0,0802	0,0801	0,080	5.10 ²	
k ₂	-	0,05	-	5,23.10 ³	
t de Student (95% confianza)= 2,12 F de Fischer (95% de confianza)= 2,66			SRC= 0,091		

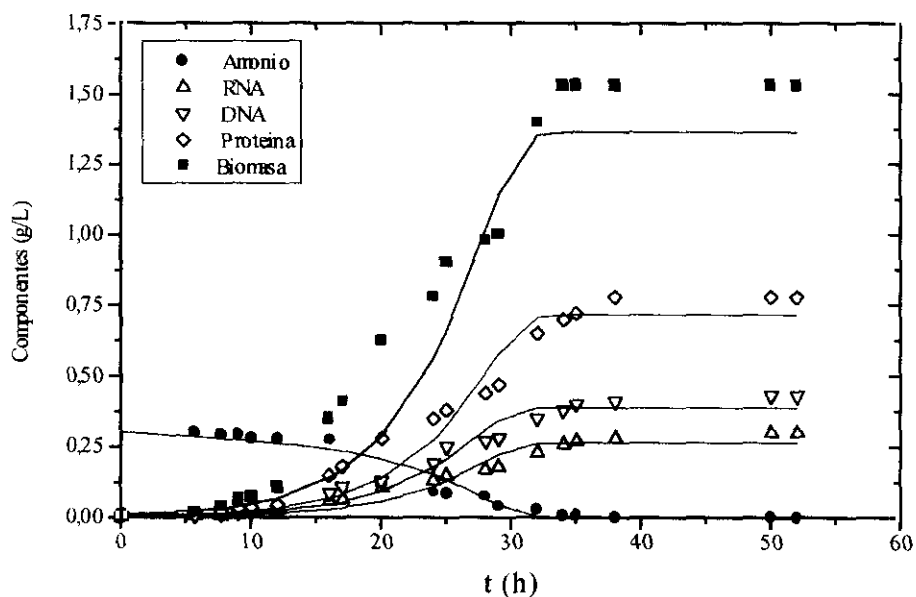


Figura 6.41.- Evoluciones de los componentes del sistema obtenidos por ajuste del experimento n° 1 (25°C y 257 p.p.m. de amonio inicial) al modelo MCC-4.

Tabla 6.51.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del experimento nº 2. Condiciones experimentales: T=28° C, C_N=257 p.p.m de amonio, N= variable (210 r.p.m. inicial) al MCC-4.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k ₁	-	0,10	-	9,2.10 ³	3825,3
K ₁	0,133	0,131	0,128	8,8.10 ³	
k ₃	0,203	0,203	0,203	1,1.10 ⁴	
K ₃	0,047	0,049	0,048	4,2.10 ³	
k ₅	-	0,039	-	1,12.10 ²	
K ₅	0,12	0,112	0,10	2.10 ²	
k ₂		0,054		2,23.10 ²	
t de Student (95% confianza)= 2,12 F de Fischer (95% de confianza)= 2,66				SRC= 0,055	

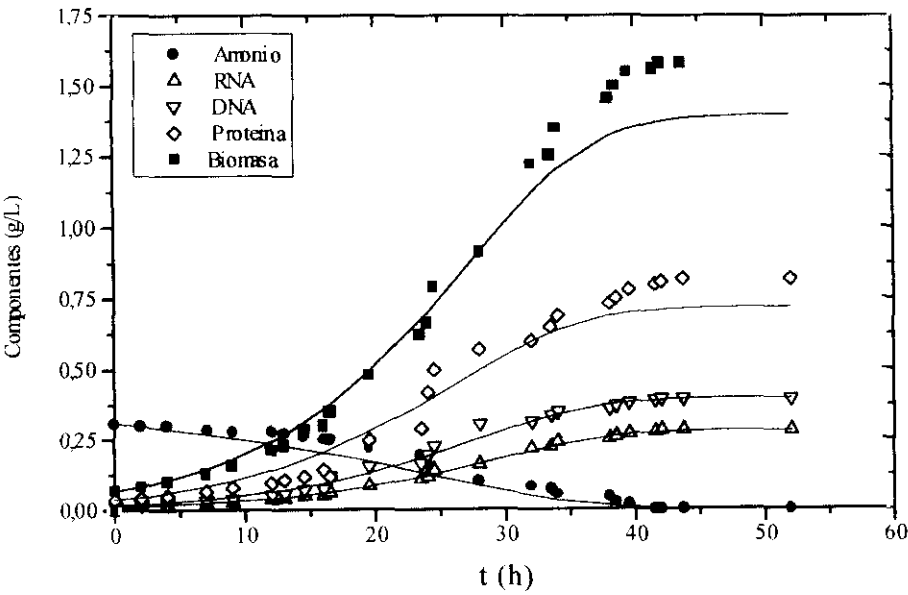


Figura 6.42.- Evoluciones de los componentes del sistema obtenidos por ajuste del experimento nº 2 (28 °C y 257 p.p.m. de amonio inicial) al modelo MCC-4..

Tabla 6.52.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del **experimento n° 3**. Condiciones experimentales: $T=31^{\circ}\text{C}$, $C_N=257$ p.p.m de amonio, $N=\text{variable}$ (210 r.p.m. inicial), al modelo MCC-4.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k ₁	-	0,102	-	5,1.10 ⁵	14825,3
K ₁	0,069	0,069	0,069	6,8.10 ⁵	
k ₃	0,022	0,022	0,022	2,1.10 ⁴	
K ₃	0,475	0,0513	0,0511	7,2.10 ⁴	
k ₅	-	0,0411	-	1,5.10 ⁴	
K ₅	0,11	0,11	0,11	6.2.10 ⁴	
k ₂	-	0,113	-	5,23.10 ³	
t de Student (95% confianza)= 2,080 F de Fischer (95% de confianza)= 2,49			SRC= 0,0045		

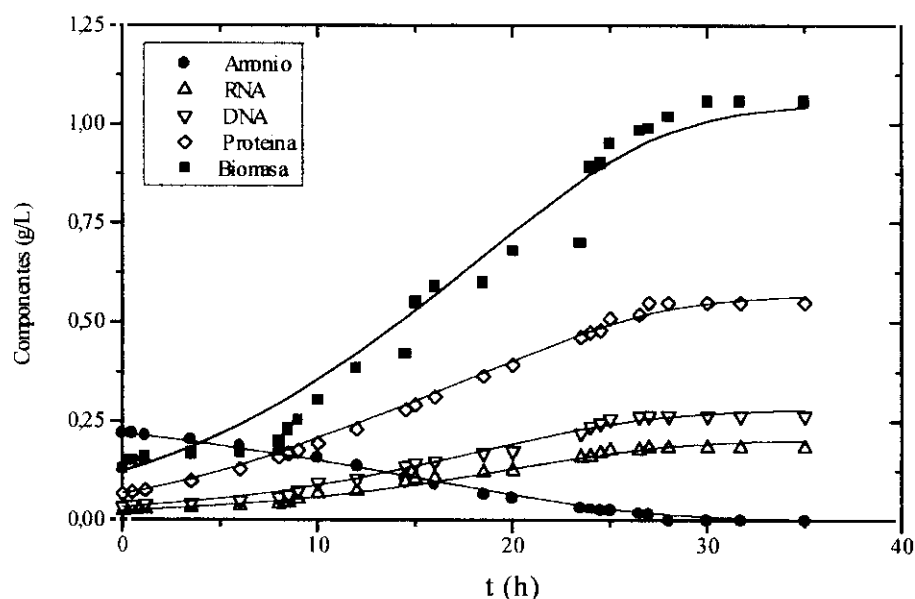


Figura 6.43.- Evolución de los componentes del sistema obtenidos por ajuste del **experimento n° 3** (31°C y 257 p.p.m. de amonio inicial) al modelo MCC-4.

Tabla 6.53.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del experimento nº 4. Condiciones experimentales: T=34° C, C_N=257 p.p.m de amonio, N= variable (210 r.p.m. inicial), al modelo MCC-4.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k ₁	-	0,106	-	3,1.10 ⁵	1131,3
K ₁	0,002	0,002	0,002	2,8.10 ⁵	
k ₃	0,036	0,036	0,036	1,1.10 ⁴	
K ₃	0,0503	0,0502	0,0501	2,2.10 ⁴	
k ₅	0,0542	0,0541	0,054	4,2.10 ⁴	
K ₅	0,1	0,1	0,1	5,1.10 ⁴	
k ₂	-	0,058	-	8,23.10 ³	
t de Student (95% confianza)= 2,12 F de Fischer (95% de confianza)= 2,66			SRC= 0,061		

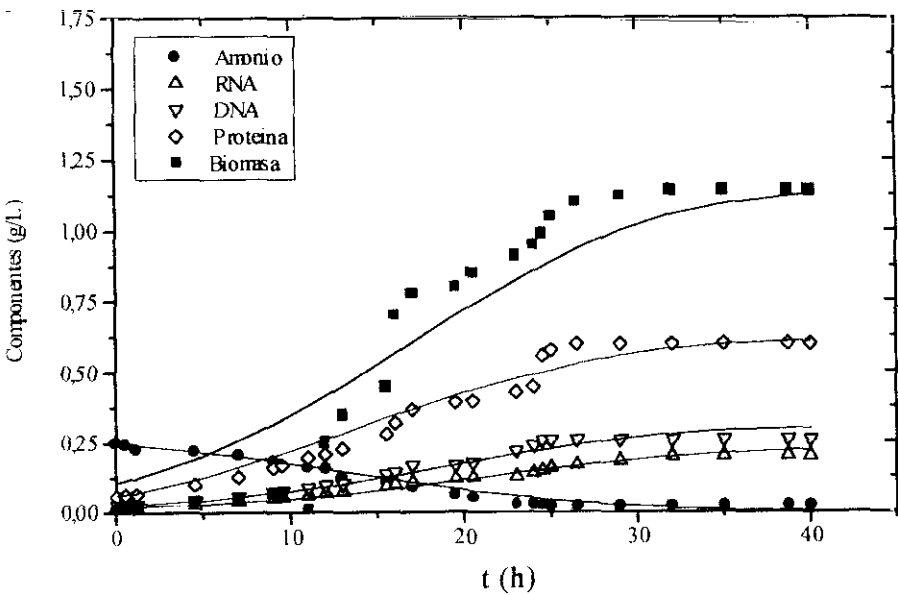


Figura 6.44.- Evoluciones de los componentes del sistema obtenidos por ajuste del experimento nº 4 (34 °C y 257 p.p.m. de amonio inicial) al modelo MCC-4..

Tabla 6.54.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del **experimento n° 5**.
Condiciones experimentales: $T=28^{\circ}\text{C}$, $C_N=65\text{ p.p.m}$ de amonio, $N=$ variable
(210 r.p.m. inicial), al modelo MCC-4.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k ₁	0,133	0,131	0,129	3,1.10 ²	135,3
K ₁	0,112	0,11	0,11	2,8.10 ³	
k ₃	0,029	0,026	0,023	1,1.10 ³	
K ₃	-	0,037	-	2,2.10 ²	
k ₅	0,0479	0,0478	0,0477	4,2.10 ³	
K ₅	0,099	0,099	0,099	5,1.10 ³	
k ₂	0,07	0,07	0,07	8,2.10 ²	
t de Student (95% confianza)= 2,179 F de Fischer (95% de confianza)= 2,70			SRC= 2,18		

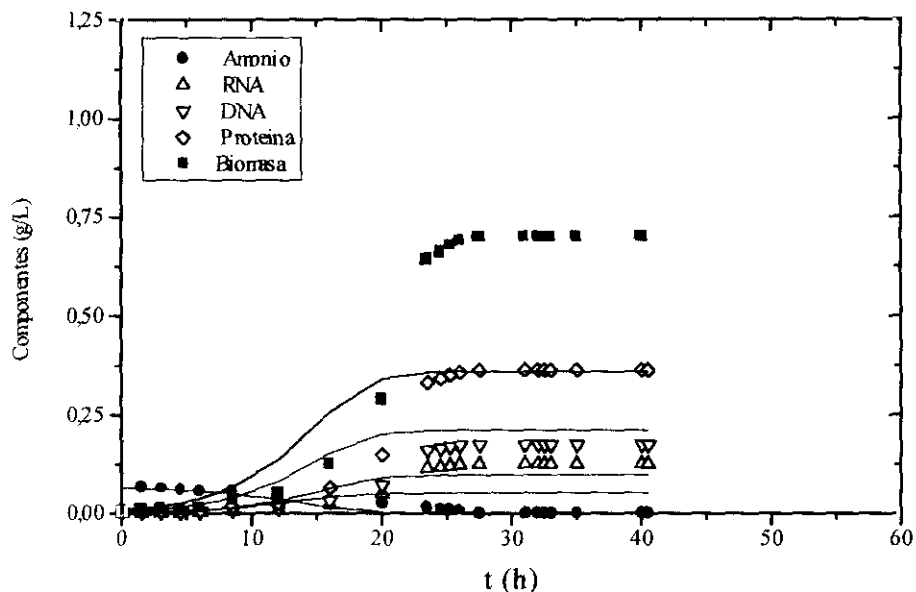


Figura 6.45.- Evolución de los componentes del sistema obtenidos por ajuste del **experimento n° 5** (28°C y 65 p.p.m. de amonio inicial) al modelo MCC-4.

Tabla 6.55.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del experimento nº 6. Condiciones experimentales: T=28° C, C_N=130 p.p.m de amonio, N= variable (210 r.p.m. inicial), al modelo MCC-4.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k ₁	0,152	0,150	0,148	3,1.10 ³	1925,3
K ₁	0,090	0,089	0,088	7,8.10 ³	
k ₃	0,029	0,029	0,029	7,1.10 ⁴	
K ₃	0,039	0,035	0,033	6,2.10 ³	
k ₅	0,06	0,06	0,06	2,3.10 ²	
K ₅	0,083	0,080	0,077	5.10 ²	
k ₂	-	0,05	-	5,23.10 ³	
t de Student (95% confianza)= 2,179 F de Fischer (95% de confianza)= 2,70			SRC= 0,52		

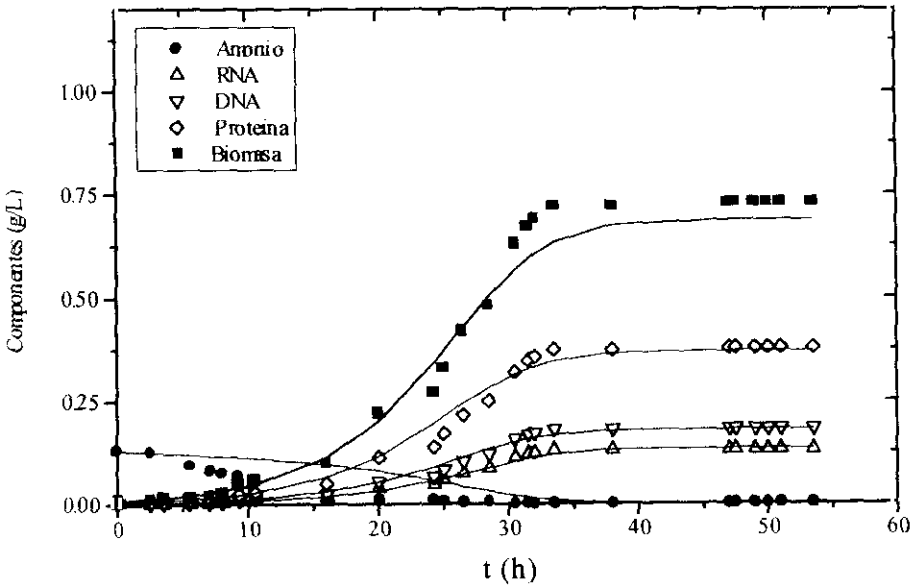


Figura 6.46.- Evoluciones de los componentes del sistema obtenidos por ajuste del experimento nº 6 (28 °C y 130 p.p.m. de amonio inicial) al modelo MCC-4.

Tabla 6.56.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del **experimento n° 7**.
Condiciones experimentales: $T=28^{\circ}\text{C}$, $C_N=475$ p.p.m de amonio, $N=$ variable
(210 r.p.m. inicial), al modelo MCC-4.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k ₁	0,130	0,130	0,130	3,1.10 ⁵	185,3
K ₁	0,112	0,11	0,10	2,8.10 ⁵	
k ₃	0,026	0,026	0,026	1,1.10 ⁴	
K ₃	0,037	0,037	0,037	2,2.10 ⁴	
k ₅	0,0478	0,0478	0,0478	4,2.10 ⁴	
K ₅	0,100	0,099	0,098	5,1.10 ⁴	
k ₂	-	0,07	-	8,23.10 ³	
t de Student (95% confianza)= 2,12 F de Fischer (95% de confianza)= 2,66			SRC= 0,95		

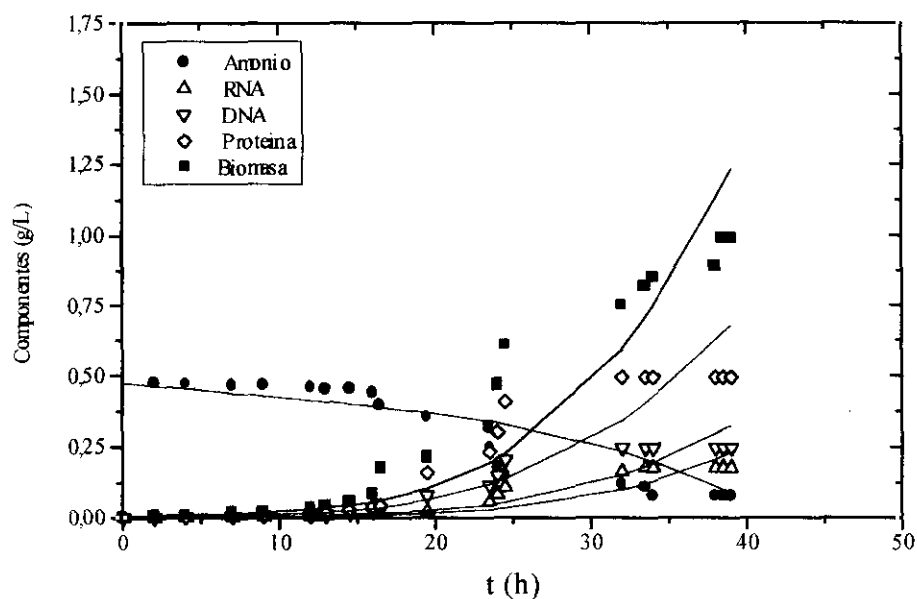


Figura 6.47.- Evoluciones de los componentes del sistema obtenidos por ajuste del **experimento n° 7** (28°C y 475 p.p.m. de amonio inicial) al modelo MCC-4.

• MCC-5

Ya se ha comentado que, debido a que podían ser empleadas tanto las ecuaciones cinéticas potenciales como hiperbólicas en las velocidades de reacción para proteínas (r_1), para RNA (r_3) y para DNA (r_5), se han realizado ajustes con cinética potenciales en estas tres reacciones (MCC-3) y con cinéticas hiperbólicas (MCC-4). Se va a proceder ahora a realizar una combinación de estas cinéticas en estas reacciones, de forma que pueden ser planteados dos modelos más, tal como se ha indicado anteriormente.

En este apartado se analiza el modelo MCC-5, donde se supone cinética hiperbólica para la reacción r_1 y potencial 2 para las correspondientes a ácidos nucleicos, esto es para RNA y para DNA. Para estas últimas, se hace la misma suposición pues es lógico pensar que las velocidades de reacción de estos dos componentes estén estrechamente relacionadas, es decir respondan al mismo tipo de cinética.

El modelo considera, al igual que en los dos casos anteriores, 4 respuestas, pero consta de 5 parámetros. El ajuste es realizado empleando regresión no lineal en múltiple respuesta. Los resultados del ajuste a este modelo (MCC-5) se muestran a continuación.

En este caso no se va a considerar el **experimento n° 5 (28°C, 65 p.p.m. de amonio)**, pues como ya se ha visto no se obtienen buenas reproducciones de los datos experimentales con ninguno de los modelos anteriores, debido, probablemente, a que la estequiometría supuesta no es válida para esta concentración tan baja de amonio.

El ajuste del **experimento n° 1 (25°C y 257 p.p.m.)** al MCC-5 permite la obtención de los parámetros que se indican en la Tabla 6.57. Los parámetros obtenidos por ajuste al modelo superan los valores teóricos de la t de Student y la F de Fischer obteniéndose una adecuada reproducción de los datos experimentales (Figura 6.48), muy similar a los dos modelos anteriores (MCC-3 y MCC-4).

Los parámetros físicos y estadísticos obtenidos por ajuste al MCC-5 para el **experimento n°2 (28°C y 257 p.p.m. de amonio)**, se muestran en la Tabla 6.58, donde se puede observar que se superan los valores teóricos de t de Student y F de Fischer con un 95% de confianza. Además, en la Figura 6.49 se observa la buena reproducción obtenida con el modelo MCC-5 con los datos experimentales.

Los parámetros obtenidos para el **experimento n° 3** realizado a **31°C** y **257 p.p.m.**, cumplen las restricciones estadísticas impuestas (Tabla 6.59), permitiendo, también una buena reproducción de los datos experimentales, como muestra la Figura 6.50.

Para el experimento realizado a **34°C** y **257 p.p.m.** de amonio inicial (**experimento n° 4**), los valores físicos y estadísticos de los parámetros se muestran en la Tabla 6.60, donde se aprecia que los valores teóricos de la *t* de Student y de la *F* de Fischer son superados en todos los casos, y en la Figura 6.51, se aprecia también la buena reproducción de los datos experimentales obtenidos para este experimento con el MCC-5.

Para el **experimento n° 6**, realizado a **28°C** y **130 p.p.m.**, se puede observar que los parámetros obtenidos cumplen las condiciones estadísticas teóricas (Tabla 6.61). El MCC-5 permite, también para este experimento, la reproducción de forma adecuada los datos de este experimento, tal como indica la Figura 6.52.

Los parámetros obtenidos por ajuste al MCC-5 para el **experimento n° 7** realizado a **28°C** y **475 p.p.m.**, cumplen las restricciones estadísticas impuestas (Tabla 6.62) la reproducción es aceptable (Figura 6.53), como ocurría en el caso anterior, pero peor si la comparamos con el resto de experimentos, lo que parece confirmar el ya citado efecto tóxico del amonio a elevadas concentraciones.

Tabla 6.57.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del experimento nº 1. Condiciones experimentales: T=25° C, C_N=257 p.p.m de amonio, N= variable (210 r.p.m. inicial), al modelo MCC-5.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k ₁	0,101	0,101	0,101	3,1.10 ⁴	1525,3
K ₁	0,02	0,02	0,02	4,2.10 ⁴	
k ₃	0,189	0,189	0,189	1,1.10 ⁵	
k ₅	0,200	0,200	0,200	1,12.10 ⁵	
k ₂	-	0,048	-	5,23.10 ³	
t de Student (95% confianza)= 2,131 F de Fischer (95% de confianza)= 2,60			SRC= 0,15		

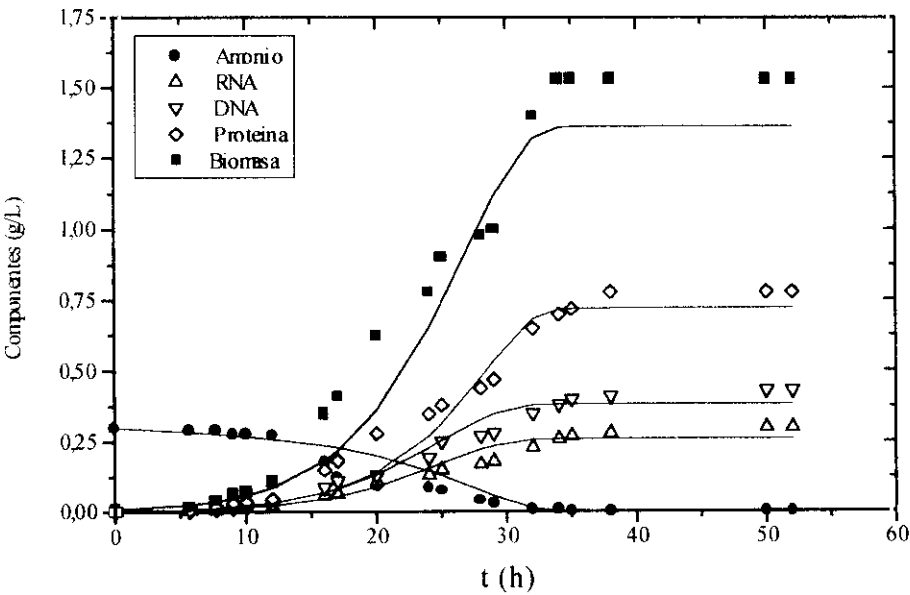


Figura 6.48.- Evoluciones de los componentes del sistema obtenidos por ajuste del experimento nº 1 (25 °C y 257 p.p.m. de amonio inicial) al modelo MCC-5.

Tabla 6.58.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del experimento n° 2. Condiciones experimentales: $T=28^{\circ}\text{C}$, $C_N=257$ p.p.m de amonio, $N=\text{variable}$ (210 r.p.m. inicial) al modelo MCC-5.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k ₁	0,102	0,102	0,102	2,2.10 ⁴	2325,3
K ₁	0,183	0,182	0,181	5,8.10 ⁴	
k ₃	0,080	0,080	0,080	3,1.10 ⁵	
k ₅	0,119	0,119	0,119	2,12.10 ⁵	
k ₂	0,0384	0,0382	0,0300	8,23.10 ³	
t de Student (95% confianza)= 2,131 F de Fischer (95% de confianza)= 2,60			SRC= 0,102		

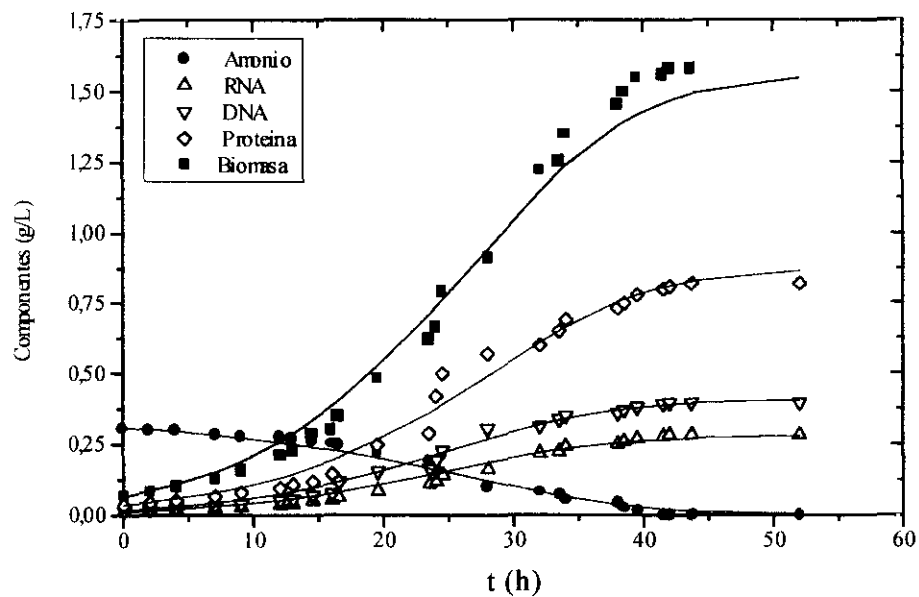


Figura 6.49.- Evoluciones de los componentes del sistema obtenidos por ajuste del experimento n° 2 (28°C y 257 p.p.m. de amonio inicial) al modelo MCC-5.

Tabla 6.59.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del experimento nº 3. Condiciones experimentales: T=31° C, C_N=257 p.p.m de amonio, N= variable (210 r.p.m. inicial) al modelo MCC-5.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k ₁	0,080	0,080	0,080	9,1.10 ⁴	3985,3
K ₁	0,0640	0,0639	0,0638	5,3.10 ⁴	
k ₃	0,119	0,119	0,119	2,1.10 ⁵	
k ₅	0,1702	0,1701	0,1700	3,12.10 ⁵	
k ₂	-	0,0949	-	1,23.10 ³	
t de Student (95% confianza)= 2,12 F de Fischer (95% de confianza)= 2,85				SRC= 0,010	

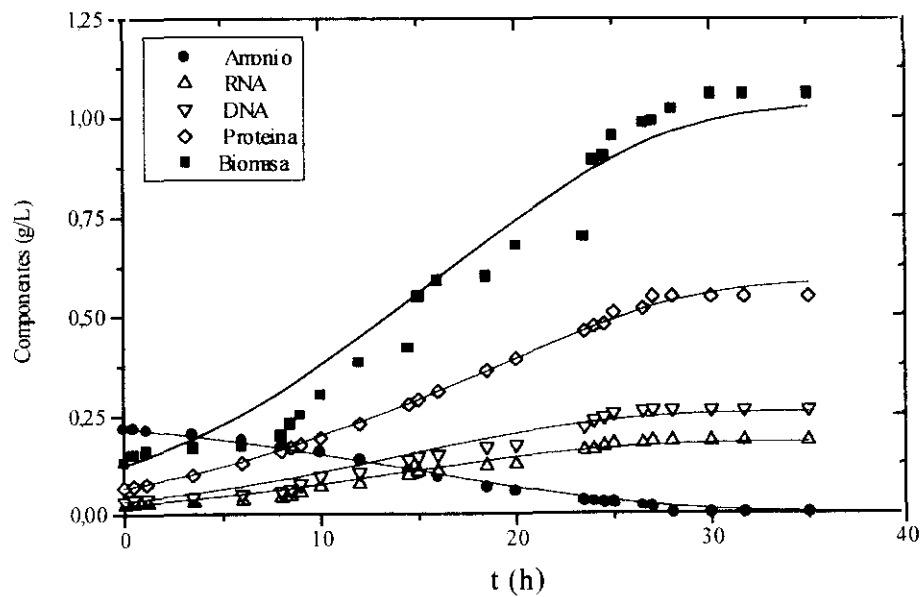


Figura 6.50.- Evoluciones de los componentes del sistema obtenidos por ajuste del experimento nº 3 (31 °C y 257 p.p.m. de amonio inicial) al modelo MCC-5..

Tabla 6.60.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del experimento n° 4. Condiciones experimentales: $T=34^{\circ}\text{C}$, $C_N=257$ p.p.m de amonio, $N=\text{variable}$ (210 r.p.m. inicial) al modelo MCC-5.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k ₁	0,10	0,10	0,10	5,1.10 ⁵	2112,8
K ₁	0,0459	0,0458	0,0457	8,3.10 ⁴	
k ₃	0,113	0,113	0,113	9,1.10 ⁵	
k ₅	0,16	0,16	0,16	7,2.10 ⁵	
k ₂	0,0775	0,0773	0,0772	4,23.10 ⁴	
t de Student (95% confianza)= 2,080 F de Fischer (95% de confianza)= 2,49			SRC= 0,12		

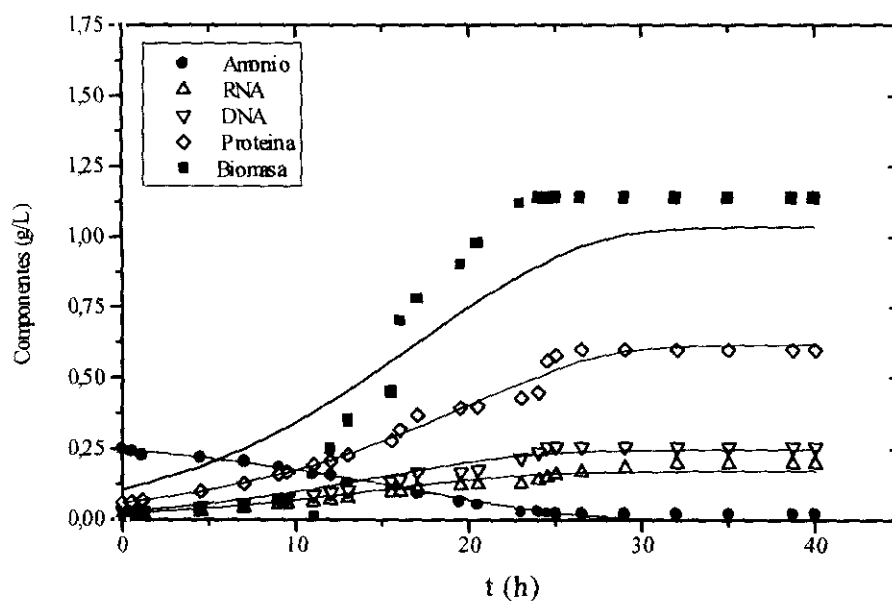


Figura 6.51.- Evoluciones de los componentes del sistema obtenidos por ajuste del experimento n° 4 (34°C y 257 p.p.m. de amonio inicial) al modelo MCC-5.

Tabla 6.61.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del experimento n° 6. Condiciones experimentales: T=28° C, C_N=130 p.p.m de amonio, N= variable (210 r.p.m. inicial) al modelo MCC-5.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k ₁	0,105	0,10	0,095	3,1.10 ³	1125,3
K ₁	0,045	0,042	0,039	4,2.10 ⁴	
k ₃	0,302	0,302	0,302	1,1.10 ⁵	
k ₅	0,440	0,440	0,440	1,12.10 ⁵	
k ₂	0,0553	0,0553	0,0553	5,23.10 ³	
t de Student (95% confianza)= 2,080 F de Fischer (95% de confianza)= 2,49				SRC= 0,96	

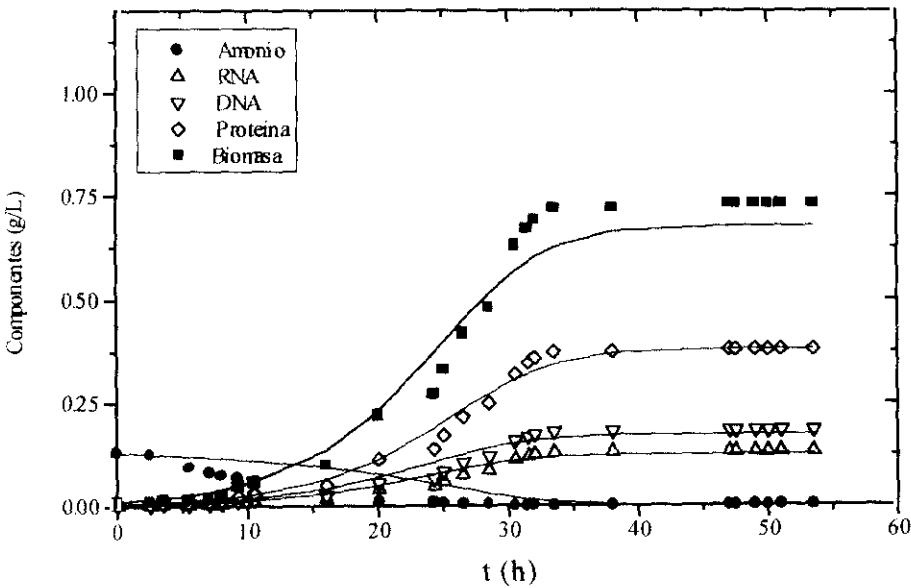


Figura 6.52.- Evoluciones de los componentes del sistema obtenidos por ajuste del experimento n° 6 (28 °C y 130 p.p.m. de amonio inicial) al modelo MCC-5..

Tabla 6.62.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del experimento n° 7. Condiciones experimentales: $T=28^{\circ}\text{C}$, $C_N=475$ p.p.m de amonio, $N=$ variable (210 r.p.m. inicial) al modelo MCC-5.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k ₁	0,102	0,10	0,098	5,1.10 ³	211,8
K ₁	0,063	0,062	0,061	5,3.10 ³	
k ₃	0,199	0,199	0,199	2,1.10 ⁴	
k ₅	0,201	0,200	0,199	3,2.10 ³	
k ₂	-	0,059	-	5,23.10 ²	
t de Student (95% confianza)= 2,12 F de Fischer (95% de confianza)= 2,85			SRC=1,2		

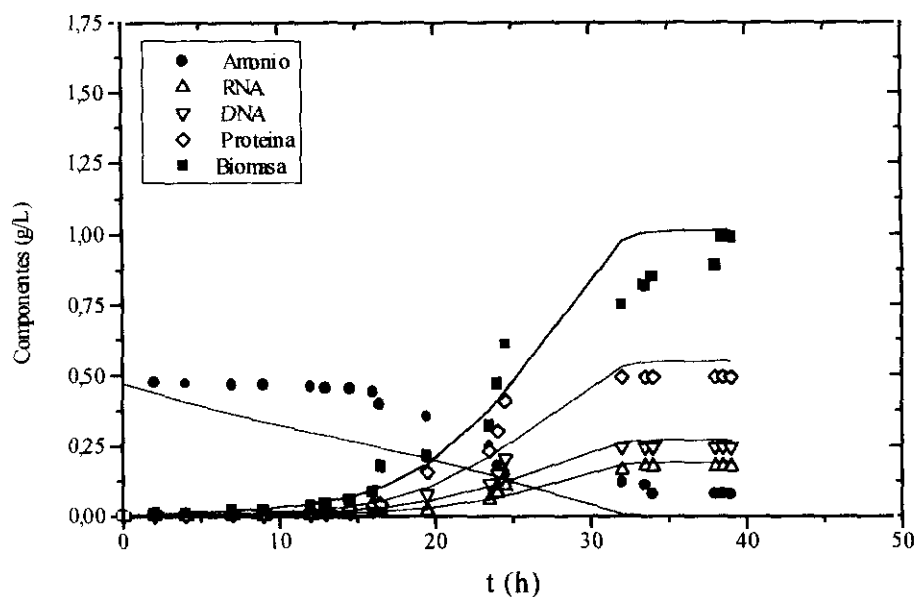


Figura 6.53.- Evoluciones de los componentes del sistema obtenidos por ajuste del experimento n° 7 (28°C y 475 p.p.m. de amonio inicial) al modelo MCC-5..

• MCC-6

Este modelo consta de 4 respuestas, y 6 parámetros, debido a que las cinéticas supuestas en este caso para cada reacción son una cinética potencial 2 para r_1 , hiperbólicas para r_3 y r_5 , y la misma que en casos anteriores, cinética potencial 1, para r_2 .

El ajuste ha sido realizado empleando regresión no lineal en múltiple respuesta. Los resultados del ajuste a este modelo (MCC-6) se muestran a continuación.

Los parámetros físicos y estadísticos obtenidos por ajuste al MCC-6 para el **experimento n°1 (25°C y 257 p.p.m. de amonio)**, se muestran en la Tabla 6.63, donde se puede observar que se superan los valores teóricos de la t de Student y de la F de Fischer con un 95% de confianza. Además, en la Figura 6.54 se representan las evoluciones de los componentes del sistema, tanto los valores teóricos como los reproducidos por el MCC-6, mostrándose el buen ajuste entre ambos.

El ajuste del **experimento n° 2 (28°C y 257 p.p.m.)** al MCC-6 permite la obtención de los parámetros que se indican en la Tabla 6.64. Los parámetros obtenidos por ajuste al modelo superan los valores teóricos de la t de Student y la F de Fischer obteniéndose una adecuada reproducción de los datos experimentales (Figura 6.55), muy similar a los dos modelos anteriores.

Los parámetros obtenidos para el **experimento n° 3** realizado a 31°C y 257 p.p.m. de nuevo cumplen las restricciones estadísticas impuestas (Tabla 6.65), permitiendo también una buena reproducción de los datos experimentales, como muestra la Figura 6.56.

Para el experimento realizado a 34°C y 257 p.p.m. de amonio inicial (**experimento n° 4**), los valores físicos y estadísticos de los parámetros se muestran en la Tabla 6.66, donde se aprecia que los valores teóricos de la t de Student y de la F de Fischer son superados en todos los casos, y la Figura 6.57 muestra la buena reproducción de los datos experimentales obtenidos para este experimento con el MCC-6.

Para el **experimento n° 6**, realizado a **28°C** y **130 p.p.m.**, los parámetros obtenidos por ajuste al MCC-6 son mostrados en la Tabla 6.67, donde se puede apreciar que superan los valores teóricos de la *t* de Student y de la *F* de Fischer. La reproducción de los datos experimentales con el MCC-6 es significativamente buena, tal como indica la Figura 6.58.

Los parámetros obtenidos por ajuste al MCC-6, para el **experimento n° 7** realizado a **28°C** y **475 p.p.m.**, cumplen las restricciones estadísticas impuestas (Tabla 6.68), superando los valores teóricos de la *t* de Student y *F* de Fischer, y obteniéndose una reproducción aceptable de los datos experimentales de este experimento (Figura 6.59).

Tabla 6.63.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del experimento nº 1. Condiciones experimentales: T=25° C, C_N=257 p.p.m de amonio, N= variable (210 r.p.m. inicial), al modelo MCC-6.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k ₁	0,673	0,67	0,667	2,2.10 ³	1921,3
k ₃	0,0311	0,0311	0,0311	2,5.10 ⁴	
K ₃	0,045	0,045	0,045	3,2.10 ⁴	
k ₅	0,0575	0,0572	0,0569	2,1.10 ⁴	
K ₅	0,085	0,085	0,085	9,3.10 ⁴	
k ₂	-	0,044	-	7,23.10 ²	
t de Student (95% confianza)= 2,093 F de Fischer (95% de confianza)= 2,63				SRC= 0,11	

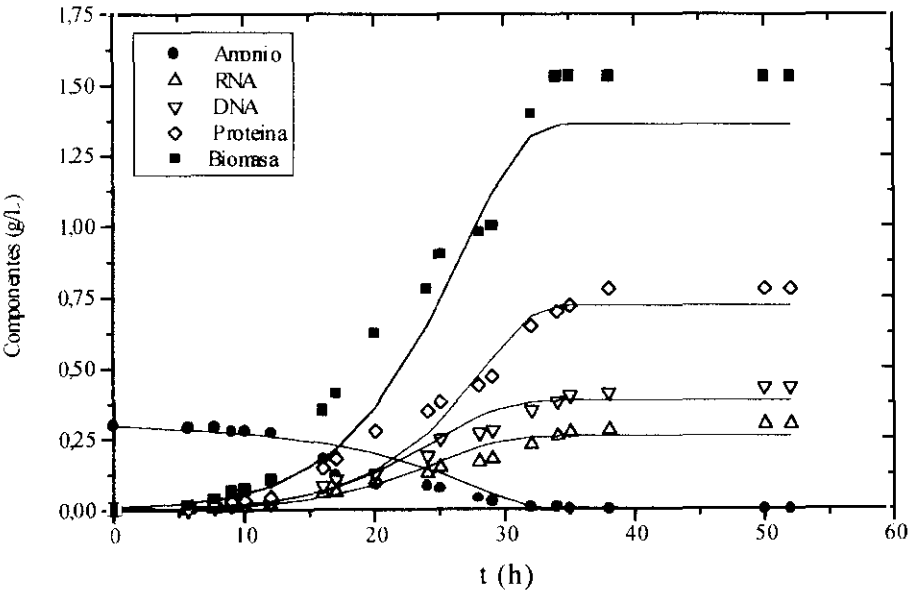


Figura 6.54.- Evoluciones de los componentes del sistema obtenidos por ajuste del experimento nº 1 (25 °C y 257 p.p.m. de amonio inicial) al modelo MCC-6.

Tabla 6.64.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del **experimento n° 2**.
Condiciones experimentales: $T=28^{\circ}\text{C}$, $C_N=257$ p.p.m de amonio, $N=$ variable (210 r.p.m. inicial) al modelo MCC-6.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k ₁	0,302	0,30	0,298	2,2.10 ³	1989,3
k ₃	0,018	0,018	0,018	7,5.10 ⁴	
K ₃	0,0502	0,05	0,05	1,2.10 ⁴	
k ₅	0,039	0,039	0,039	3,3.10 ⁴	
K ₅	0,11	0,11	0,11	5,3.10 ⁴	
k ₂	0,078	0,076	0,074	5,3.10 ²	
t de Student (95% confianza)= 2,093 F de Fischer (95% de confianza)= 2,63			SRC= 0,095		

t de Student (95% confianza)= 2,093

F de Fischer (95% de confianza)= 2,63

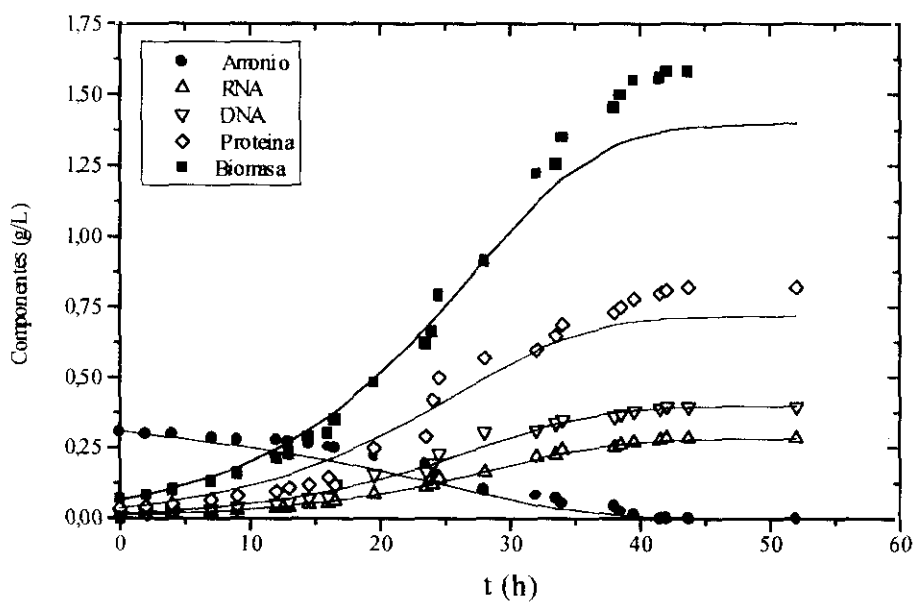


Figura 6.55.- Evoluciones de los componentes del sistema obtenidos por ajuste del **experimento n° 2** (28°C y 257 p.p.m. de amonio inicial) al modelo MCC-6.

Tabla 6.65.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del experimento n° 3. Condiciones experimentales: T=31° C, C_N=257 p.p.m de amonio, N= variable (210 r.p.m. inicial) al modelo MCC-6.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k ₁	0,402	0,401	0,400	4,2.10 ⁴	3899,3
k ₃	0,018	0,018	0,018	1,5.10 ⁴	
K ₃	0,051	0,051	0,051	5,2.10 ⁴	
k ₅	0,036	0,036	0,036	7,2.10 ⁴	
K ₅	0,11	0,11	0,11	6,3.10 ⁴	
k ₂	-	0,076	-	1,23.10 ²	
t de Student (95% confianza)= 2,101 F de Fischer (95% de confianza)= 2,66			SRC= 0,005		

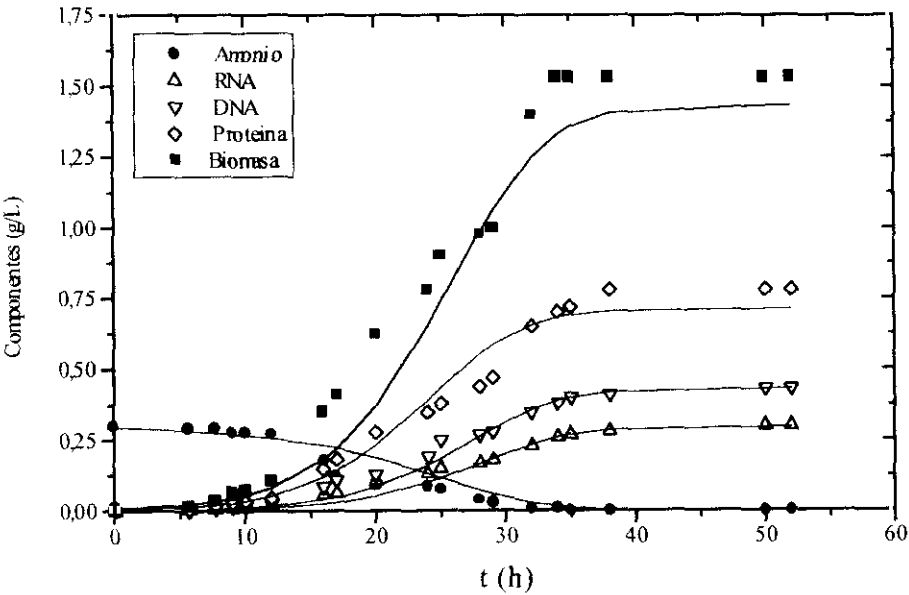


Figura 6.56.- Evoluciones de los componentes del sistema obtenidos por ajuste del experimento n° 3 (31 °C y 257 p.p.m. de amonio inicial) al modelo MCC-6..

Tabla 6.66.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del **experimento n° 4**. Condiciones experimentales: $T=34^{\circ}\text{C}$, $C_N=257$ p.p.m de amonio, $N=\text{variable}$ (210 r.p.m. inicial) al modelo MCC-6.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k ₁	0,54	0,53	0,52	3,2.10 ⁴	3911,2
k ₃	0,0173	0,0172	0,0171	2,7.10 ⁴	
K ₃	0,05	0,05	0,05	4,3.10 ⁴	
k ₅	0,0359	0,0359	0,0359	5,3.10 ⁴	
K ₅	0,103	0,10	0,101	4,3.10 ⁴	
k ₂	-	0,0604	-	9,23.10 ³	
t de Student (95% confianza)= 2,01 F de Fischer (95% de confianza)= 2,66			SRC= 0,011		

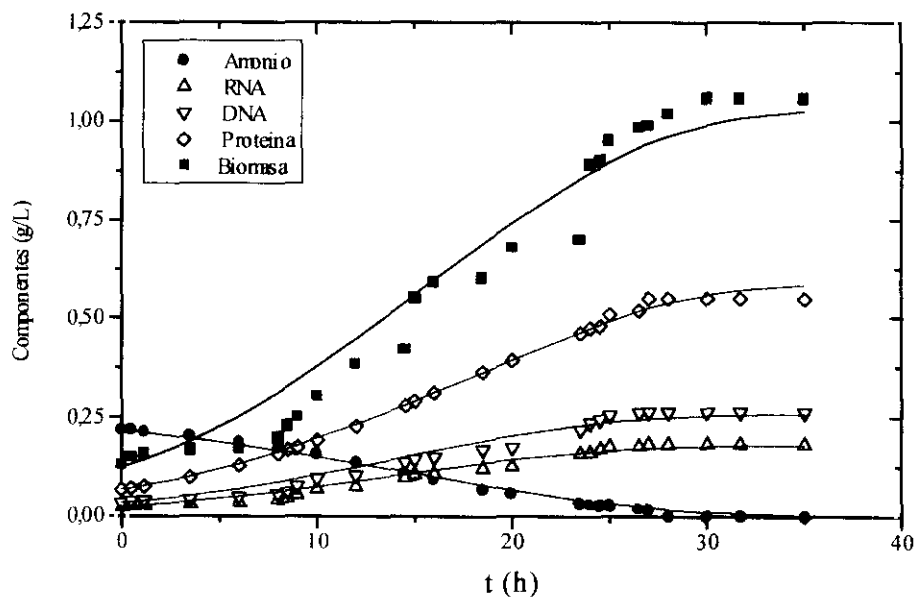


Figura 6.57.- Evoluciones de los componentes del sistema obtenidos por ajuste del **experimento n° 4** (34°C y 257 p.p.m. de amonio inicial) al modelo MCC-6..

Tabla 6.67.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del experimento nº 6. Condiciones experimentales: T=28° C, C_N=130 p.p.m de amonio, N= variable (210 r.p.m. inicial) al modelo MCC-6.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k ₁	0,802	0,801	0,800	2,2.10 ³	1399,3
k ₃	0,0272	0,0271	0,0270	2,5.10 ⁴	
K ₃	0,042	0,042	0,042	3,2.10 ⁴	
k ₅	0,054	0,054	0,054	2,,10 ⁴	
K ₅	0,079	0,079	0,079	9,3.10 ⁴	
k ₂	0,036	0,035	0,034	7,23.10 ²	
t de Student (95% confianza)= 2,086 F de Fischer (95% de confianza)= 2,60			SRC= 0,894		

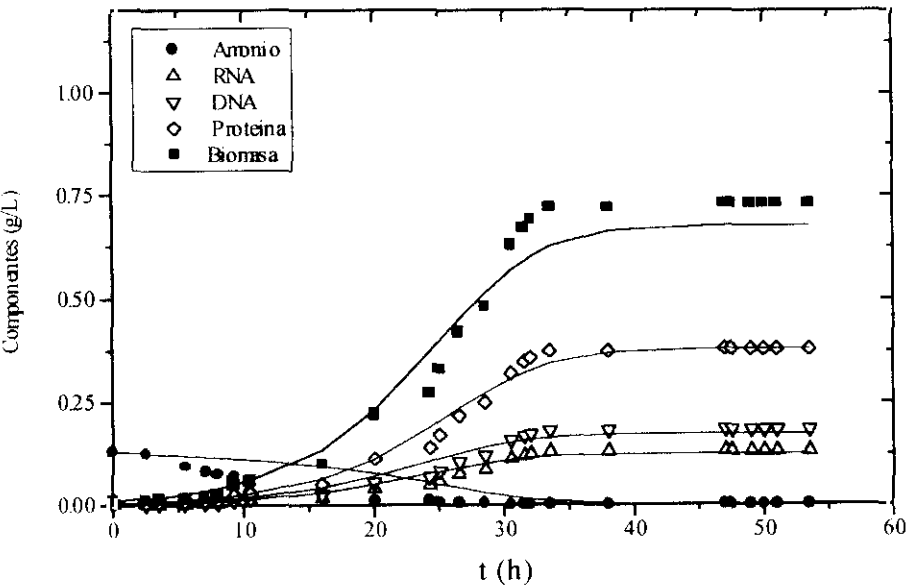


Figura 6.58.- Evoluciones de los componentes del sistema obtenidos por ajuste del experimento nº 6 (28 °C y 130 p.p.m. de amonio inicial) al modelo MCC-6..

Tabla 6.68.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del **experimento n° 7**. Condiciones experimentales: **T=28° C**, **C_N=475 p.p.m** de amonio, **N= variable (210 r.p.m. inicial)** al modelo **MCC-6**.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k ₁	0,532	0,531	0,530	3,2.10 ⁴	611,2
k ₃	0,017	0,017	0,017	2,7.10 ⁴	
K ₃	0,055	0,05	0,05	4,3.10 ⁴	
k ₅	0,03595	0,0359	0,3585	5,3.10 ⁴	
K ₅	0,10	0,10	0,10	4,3.10 ⁴	
k ₂	-	0,0604	-	9,23.10 ³	
t de Student (95% confianza)= 2,080 F de Fischer (95% de confianza)= 2,49			SRC= 0,93		

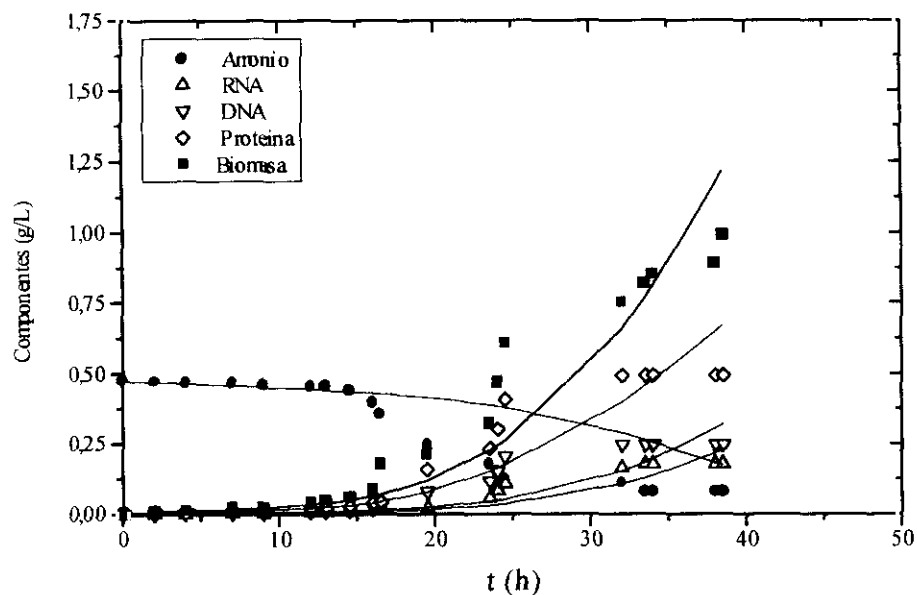


Figura 6.59.- Evoluciones de los componentes del sistema obtenidos por ajuste del **experimento n° 7 (28 °C y 475 p.p.m. de amonio inicial)** al modelo **MCC-6**.

6.2.4. Discriminación entre Modelos Cinéticos

En el apartado anterior se han mostrado los ajustes de los datos experimentales a los diferentes modelos propuestos para el crecimiento de la bacteria *Xanthomonas campestris*, a continuación se va a tratar de seleccionar el modelo de acuerdo a los criterios antes comentados.

6.2.4.1. Criterios Estadísticos

Entre los dos esquemas de reacción simplificados propuestos, que corresponden a los modelos MCC-1 y MCC-2, se ha observado que el primero no permite obtener una reproducción de las velocidades de producción de los diferentes componentes clave de los distintos experimentos realizados, por lo cual el citado modelo ha sido descartado según un criterio estadístico, considerando que el valor de SRC es significativamente alto, lo que se traduce en una mala reproducción de los datos experimentales de todos los experimentos ajustados con el MCC-1.

Para MCC-2, se plantearon diferentes posibilidades en función de las ecuaciones cinéticas probadas en r_1 , r_3 y r_5 . La velocidad r_2 , en todos los modelos ha sido potencial 1, pues, como ya se vió, parece ser la única cinética con la que se obtienen parámetros con valores estadísticos aceptables.

Así pues, se realizó el ajuste con distintas suposiciones en las cinéticas de estas reacciones, tal como se ha indicado en el apartado anterior. Se han propuesto así cuatro modelos, cuyas velocidades de producción corresponden a la indicada para la simplificación 2 (MCC-2), pero variando las cinéticas de las velocidades de reacción y efectuando diversas combinaciones entre ellas (MCC-3, MCC-4, MCC-5 y MCC6). Como se ha podido apreciar, estos cuatro modelos permiten, para todos los experimentos, obtener unos parámetros con valores estadísticos significativamente buenos. En todos los casos, los valores estadísticos de los parámetros obtenidos superan los valores teóricos de F de Fischer y de t de Student, obteniéndose en todos los casos unos intervalos de confianza muy estrechos. Por otro lado, los valores de SRC (suma de residuos al cuadrado) parecen ser

indicativos de las buenas reproducciones que se han obtenido en todos los ajustes; no obstante, puesto que este valor es una forma de medir la reproducibilidad de los datos experimentales, se muestran en la Tabla 6.69 los distintos valores de SRC obtenidos en cada uno de los experimentos, para los cuatro modelos, con el fin de analizar si este puede ser un criterio de discriminación entre ellos.

Tabla 6. 69.- Valores de SRC (suma de residuos al cuadrado) obtenidos en los ajustes a diferentes modelos de célula para cada uno de los experimentos realizados.

	Experimento n° 1	Experimento n° 2	Experimento n° 3	Experimento n° 4	Experimento n° 6	Experimento n° 7
MCC-3	0,088	0,060	0,008	0,030	0,075	0,750
MCC-4	0,091	0,055	0,005	0,061	0,520	0,950
MCC-5	0,150	0,102	0,010	0,120	0,960	1,200
MCC-6	0,110	0,095	0,005	0,011	0,894	0,930

Se puede observar que los valores más bajos de SRC, indicativos de un mejor ajuste, se obtienen para los modelos MCC-3 y MCC-4, cumpliéndose esto para todos los experimentos, lo que podría suponer un criterio aceptable para discriminar respecto a los otros dos modelos propuestos (MCC-5 y MCC-6). Estos últimos dan buen resultado desde un punto de vista estadístico, y además, permiten obtener una buena reproducción de los datos experimentales, no obstante según el criterio de discriminación por el valor de SRC se podrían descartar respecto a los otros dos.

En comparación al modelo MCC-3, que tiene 4 parámetros, los modelos MCC-5 (5 parámetros) y MCC-6 (6 parámetros) ajustan peor, esto es, se obtienen valores de la suma de residuos al cuadrado (SRC) más altos a pesar de tener un mayor número de parámetros, lo cual permite un mejor ajuste debido a que, desde un punto de vista matemático se le proporciona al sistema un mayor grado de libertad, lo que debería permitir una mejora en el ajuste, es decir valores menores de SRC.

Por otro lado, el modelo MCC-4 que posee 7 parámetros, no presenta valores de SRC significativamente inferiores a los obtenidos con MCC-3, a pesar de que sería de esperar un mejor ajuste debido a que este modelo dispone de más grados de libertad. Los valores de la suma de residuos al cuadrado, presentados en la Tabla 6.69, son muy semejantes entre ambos modelos, solo se obtiene un valor inferior de SRC respecto al modelo MCC-3 para el experimento nº6, en el resto, son superiores a los presentados por el MCC-3.

En vista de esto, se podría discernir entre ambos modelos decantándonos por el MCC-3, no obstante y dado la similitud en los valores de suma de residuos al cuadrado se van a comparar los cuatro modelos mediante criterios físicos, por si estos pudieran aportar datos para llegar a una conclusión más clara.

Como se comentó al principio de este capítulo, un criterio físico de discriminación es la evolución de los parámetros con las variables estudiadas.

Es necesario comentar que el experimento realizado con 65 p.p.m. de amonio inicial, no ha sido considerado como experimento comparativo con los demás. A pesar de obtener valores estadísticos aceptables para este experimento, la reproducción de los distintos componentes del sistema no ha sido buena, observándose valores de SRC significativamente elevados. Esto, como ya ha sido comentado a lo largo de la exposición de este apartado parece ser debido a que la estequiometría supuesta no sería la adecuada en el caso de concentraciones tan bajas de sustrato nitrogenado. Al principio de este capítulo, se pudo observar que, al efectuar el balance de nitrógeno para los componentes del sistema en este experimento, “faltaba” nitrógeno, es decir la cantidad de nitrógeno que se adicionaba al medio, era inferior a la encontrada en los componentes. Todo esto parece indicar que la composición del microorganismo cambia ligeramente con la composición del medio. Por lo que, a ciertas concentraciones de sustrato nitrogenado, la suposición efectuada para el modelo propuesto puede no ser adecuada en ciertos casos. Más adelante se volverá a comentar este aspecto y se realizará un cambio de estequiometría para verificar lo que se acaba de comentar.

6.2.4.2.- Discriminación por Criterios Físicos: variación de los parámetros con las variables

En este apartado se comparan las distintas tendencias que presentan los parámetros en función de las variables: temperatura y concentración inicial de nitrógeno. Se van a analizar las tendencias para cada una de los parámetros en los modelos que han sido finalmente considerados: MCC-3 y MCC-4, aunque también se incluyen los otros dos modelos MCC-5 y MCC-6.

• Variación de parámetros del MCC-3 con la temperatura

Como ya ha sido expuesto, este modelo consta de cuatro parámetros, debido a las cinéticas potenciales supuestas en este caso. En las Figura 6.60 se muestran las evoluciones de los parámetros correspondientes a cada una de las velocidades de reacción.

La línea continua es la curva real obtenida del valor de los parámetros, la discontinua indica la tendencia de la función matemática a la que podría ser ajustada a la vista de dicha evolución.

Como se aprecia en la Figura 6.60, el parámetro k_1 , correspondiente a la reacción r_1 (proteínas), muestra una tendencia descendente con la temperatura. Los parámetros correspondientes a las reacciones de velocidad de ácidos nucleicos (k_3 y k_5) muestran una tendencia más o menos constante con la temperatura, Figuras 6.60b y 6.60c. Aunque parece que hay una cierta tendencia descendente (línea continua), no son valores significativamente distintos, por lo que se podría considerar que el valor es constante con la temperatura.

Finalmente el parámetro k_2 , correspondiente a la velocidad de reacción de los aminoácidos no formadores de bases (r_2), muestra una tendencia con un máximo, lo cual podría ser ajustado a una función tipo Ratkowsky, como ya se ha visto en capítulos anteriores.

• Variación de parámetros del MCC-4 con la temperatura

En cuanto a la evolución de parámetros con esta variable, para el modelo MCC-4, se aprecia que la tendencia presentada por los parámetros de la reacción r_1 es distinta. El parámetro k_1 , que es el parámetro del numerador presenta un valor constante con la temperatura, mientras que el parámetro del denominador K_1 , presenta una tendencia pasando por un máximo, como se indica en la Figura 6.61 a.

Los parámetros correspondientes a las ecuaciones cinéticas r_3 y r_5 presentan tendencias similares con la variable en ambos casos, tal como indica la Figura 6.61b y 6.61c; se puede asumir que tanto los parámetros del numerador como del denominador de la ecuación cinética correspondiente no varían con la temperatura.

Por último, el parámetro k_2 correspondiente a la reacción r_2 , muestra una tendencia similar al caso observado en el modelo MCC-3, tal como indica la Figura 6.61d.

• Variación de parámetros del MCC-5 con la temperatura

En este modelo se consideró la velocidad de reacción para r_1 como una cinética hiperbólica, es decir con dos parámetros, cuya evolución se muestra en la Figura 6.62a. En ella se aprecia que, al igual que en el caso anterior, el parámetro del numerador (k_1) presenta una tendencia constante con la temperatura, mientras que el del denominador pasa por un máximo (K_1). Los parámetros correspondientes a r_3 y r_5 tienen tendencias constantes con la variable, como indican las Figuras 6.62b y 6.62c.

El parámetro k_2 correspondiente a la reacción r_2 , no muestra la tendencia hiperbólica observada en el modelo MCC-3 y MCC4. En este modelo, el parámetro k_2 no parece tener una tendencia clara con la temperatura, lo que podría ser un criterio de discriminación de este modelo MCC-5, frente a los dos anteriores.

- **Variación de parámetros del MCC-6 con la temperatura**

En este modelo se consideró la velocidad de reacción para r_1 como una cinética potencial tipo 1. Como se aprecia en la Figura 6.63, el parámetro k_1 , muestra una tendencia similar a una hipérbola invertida. Función muy diferente a la obtenida en los modelos anteriores y poco explicable

Los parámetros correspondientes a r_3 y r_5 tienen tendencias constantes con la variable, como indica la Figura 6.63b y 6.63c, al igual que ha sido observado en el resto de los modelos, con independencia de que las cinéticas fuesen potenciales o hiperbólicas.

El parámetro k_2 , correspondiente a la reacción r_2 , no muestra la tendencia hiperbólica observada en el modelo MCC-3 y MCC-4. La curva es algo más suave a lo visto en estos dos modelos comentados, tal como se aprecia en la Figura 6.63b.

De nuevo puede afirmarse que los modelos MCC-5 y MCC-6 no aportan nada sobre el MCC-3, ya que la variación de parámetros con la temperatura es más razonable en los modelos MCC-3 y MCC-4.

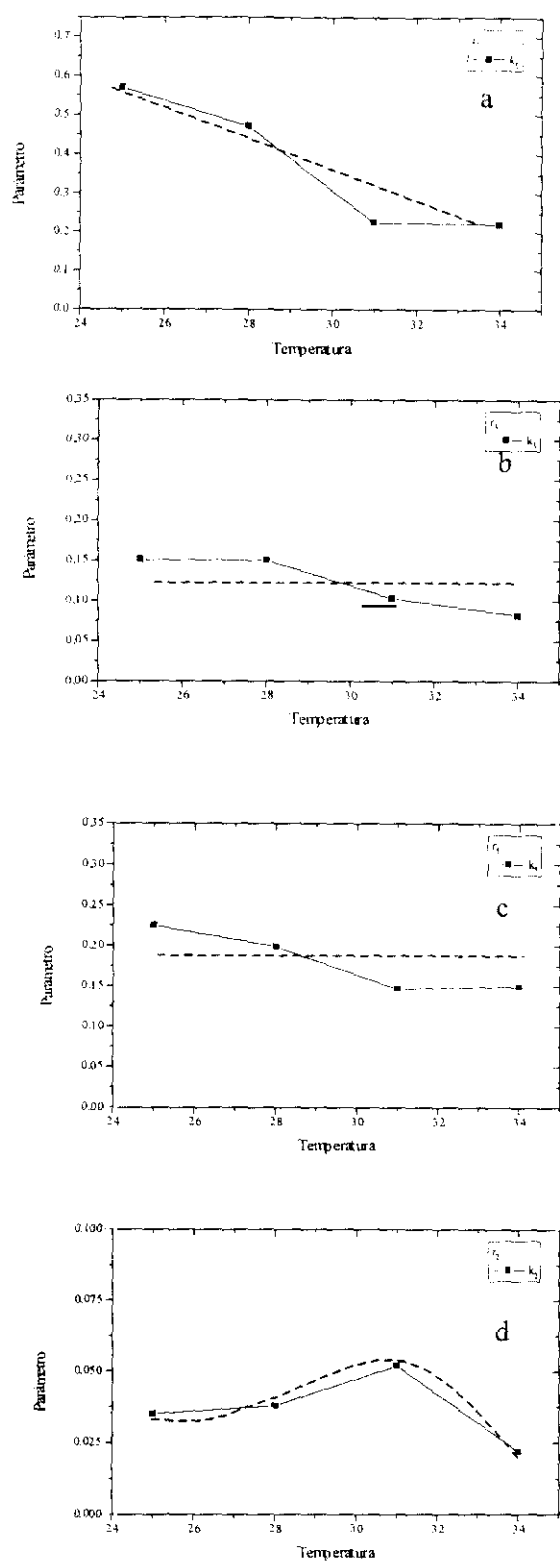


Figura 6.60.- Variación de los parámetros del modelo cinético de célula MCC-3 con la Temperatura.

- a) parámetro para la velocidad r_1 b) parámetro para la velocidad r_3
 c) parámetro para la velocidad r_5 d) parámetro para la velocidad r_2

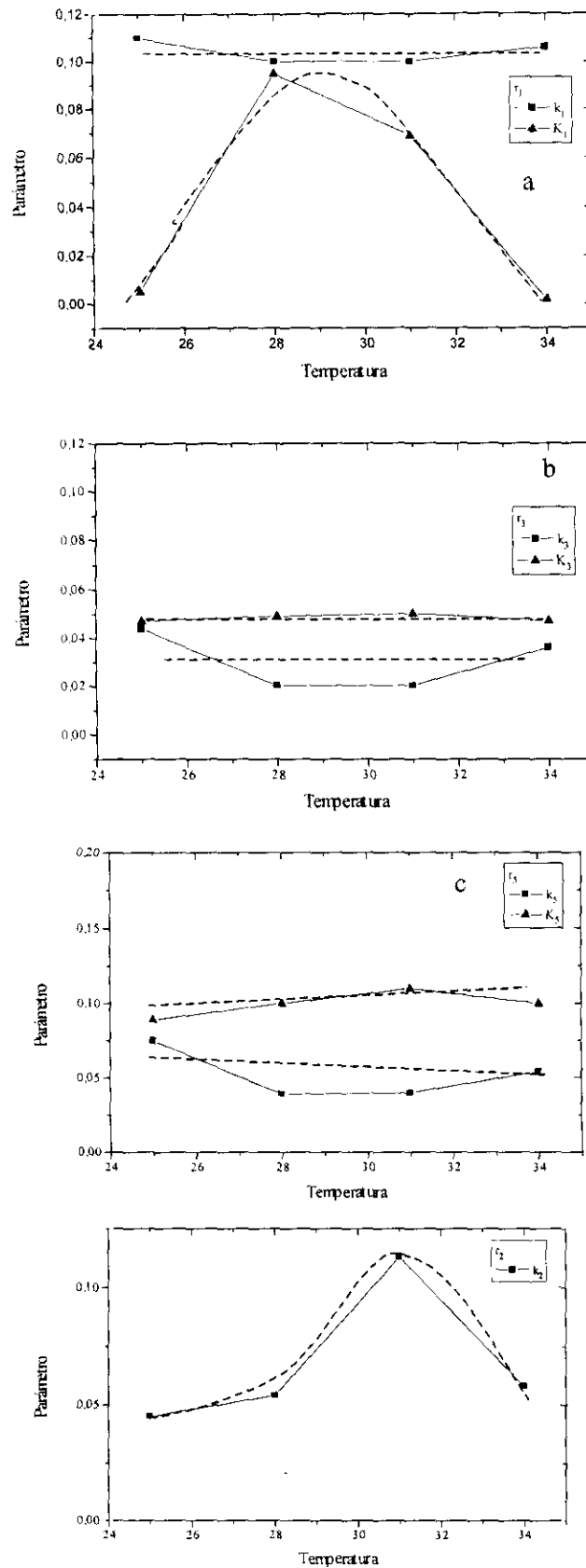


Figura 6.61.- Variación de los parámetros del modelo cinético de célula MCC-4 con la Temperatura.

a) parámetro para la velocidad r_1
c) parámetro para la velocidad r_5

b) parámetro para la velocidad r_3
d) parámetro para la velocidad r_2

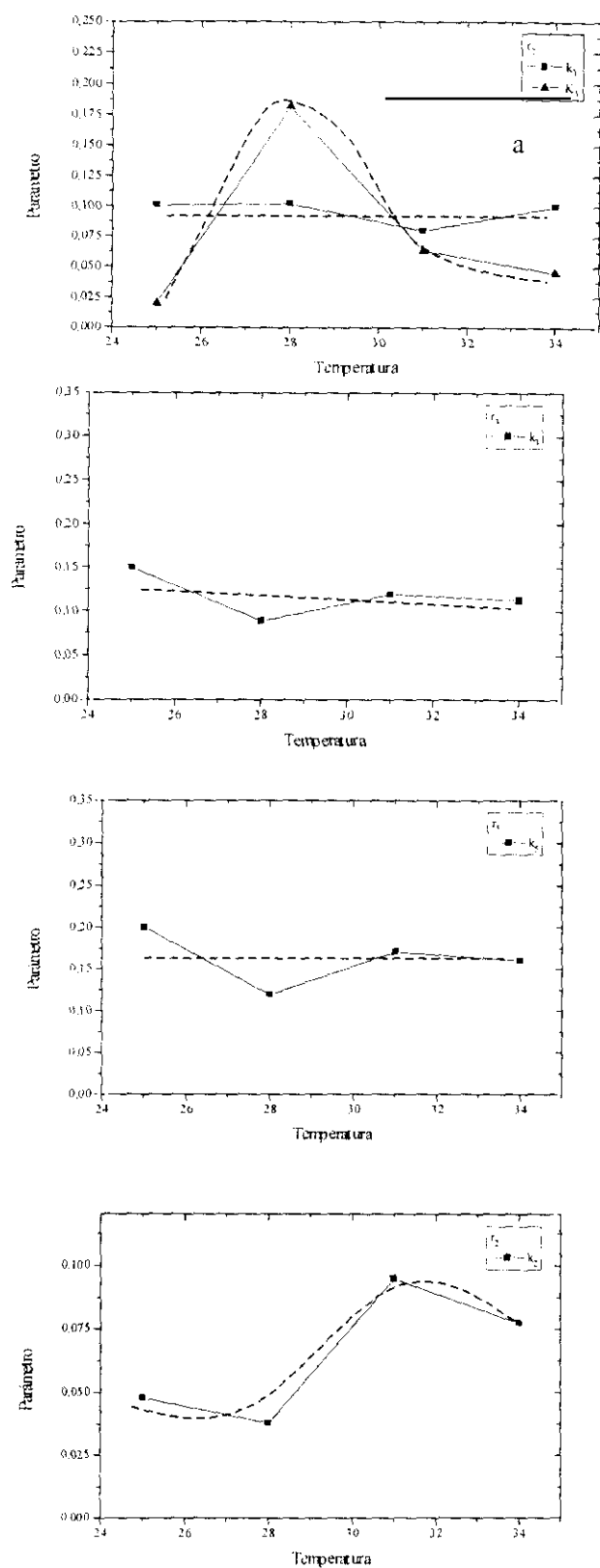


Figura 6.62.- Variación de los parámetros del modelo cinético de célula MCC-5 con la Temperatura.

- a) parámetro para la velocidad r_1 b) parámetro para la velocidad r_3
 c) parámetro para la velocidad r_5 d) parámetro para la velocidad r_2

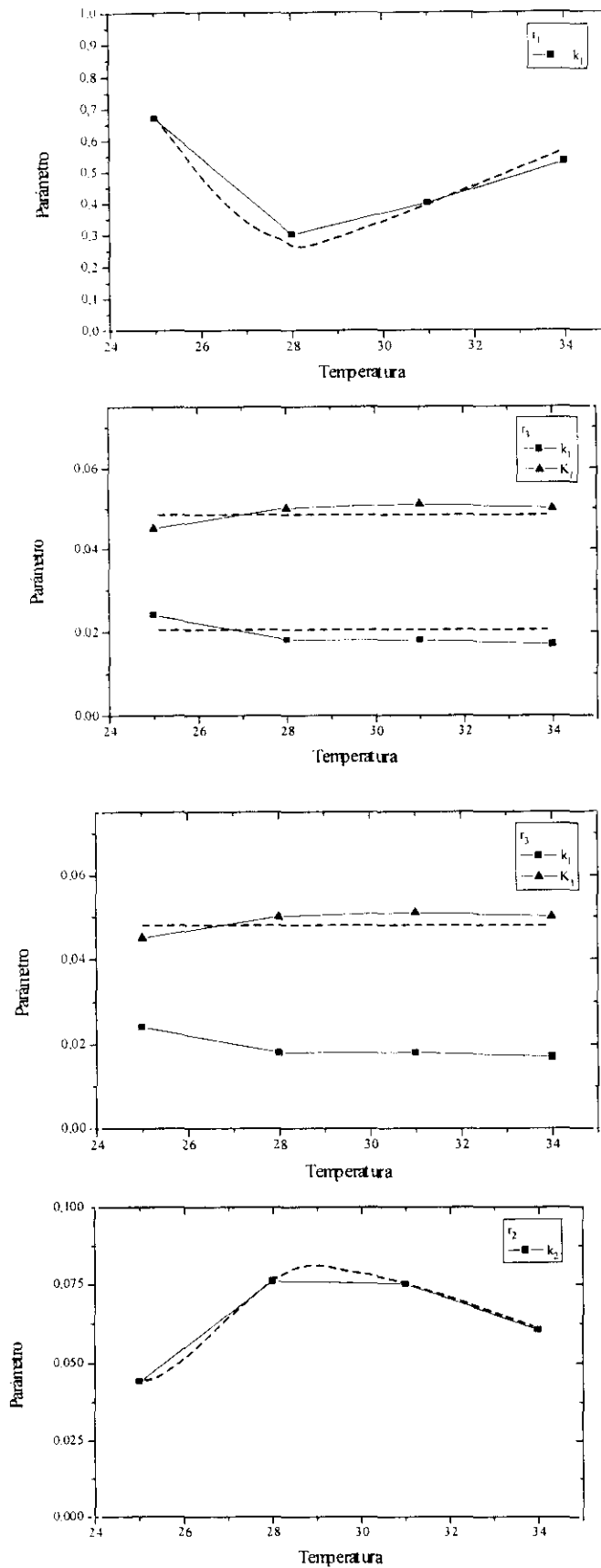


Figura 6.63.- Variación de los parámetros del modelo cinético de célula MCC-6 con la Temperatura.

a) parámetro para la velocidad r_1
c) parámetro para la velocidad r_5

b) parámetro para la velocidad r_3
d) parámetro para la velocidad r_2

- **Variación de parámetros del MCC-3 con la Concentración Inicial de Amonio**

En cuanto a la evolución de parámetros con esta variable, para el modelo MCC-3, se aprecia que la tendencia presentada por todos es similar.

En la Figura 6.64 se muestra que, para todos los parámetros de este modelo, no hay una tendencia, el valor es constante. Es decir, su valor no varía con la concentración de amonio inicial, por lo que se concluye que la concentración de amonio inicial no influye en la variación de los parámetros del modelo, tal como cabía esperar.

- **Variación de parámetros del MCC-4 con la Concentración Inicial de Amonio**

En este caso se puede asumir que la tendencia de los parámetros con la variación de la concentración inicial de amonio es constante, al igual que en el caso anterior.

En la Figura 6.65, aparecen representados los parámetros en función de esta variable para cada una de las velocidades de reacción.

- **Variación de parámetros del MCC-5 con la Concentración Inicial de Amonio**

En este caso, la tendencia de los parámetros con la variación de la concentración inicial de amonio es también constante, al igual que en los dos casos anteriores. No obstante, si observamos la Figura 6.66, los parámetros k_3 y k_5 , Figuras 6.66b y 6.66c respectivamente, muestran cierta tendencia hacia un mínimo con la concentración de amonio de 257 p.p.m.

- **Variación de parámetros del MCC-6 con la Concentración Inicial de Amonio**

Como se aprecia en la Figura 6.67, la tendencia de todos los parámetros del modelo es constante, es decir, el valor de los parámetros no cambia significativamente con la concentración inicial de amonio, al igual que en los casos anteriores.

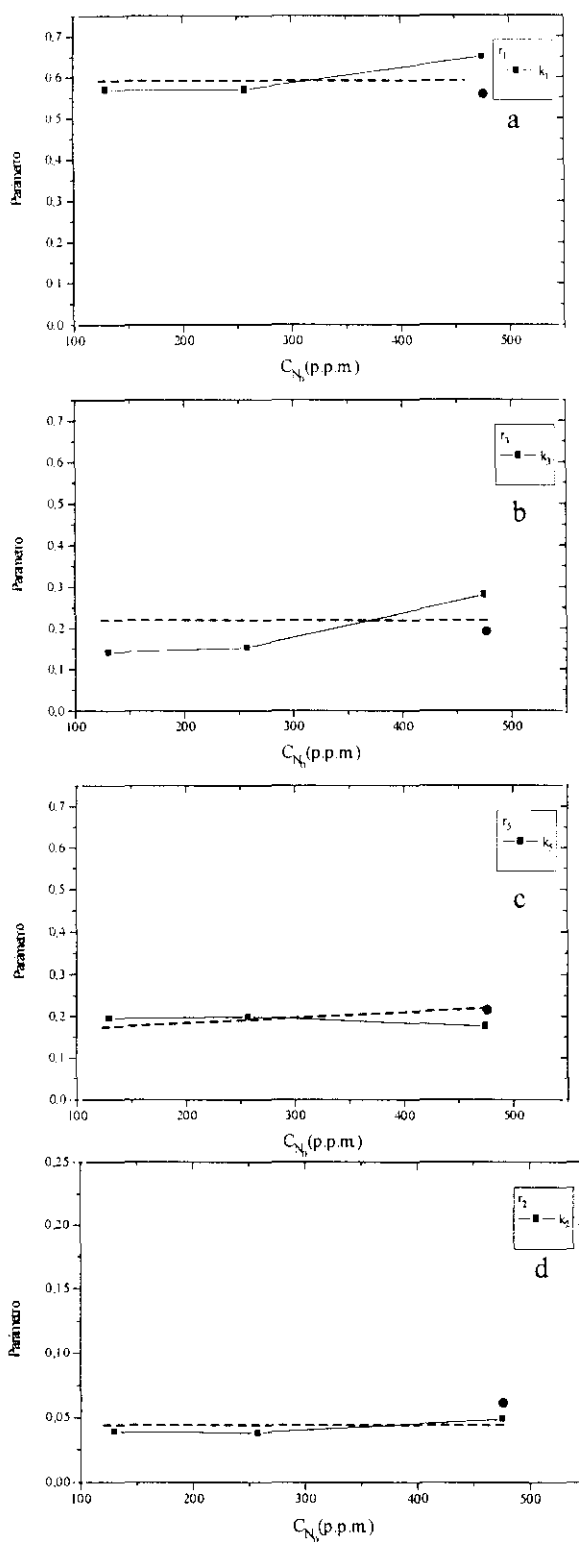


Figura 6.64.- Variación de los parámetros del modelo cinético de célula MCC-3 con la concentración inicial de amonio.

- a) parámetro para la velocidad r_1 b) parámetro para la velocidad r_3
 c) parámetro para la velocidad r_5 d) parámetro para la velocidad r_2

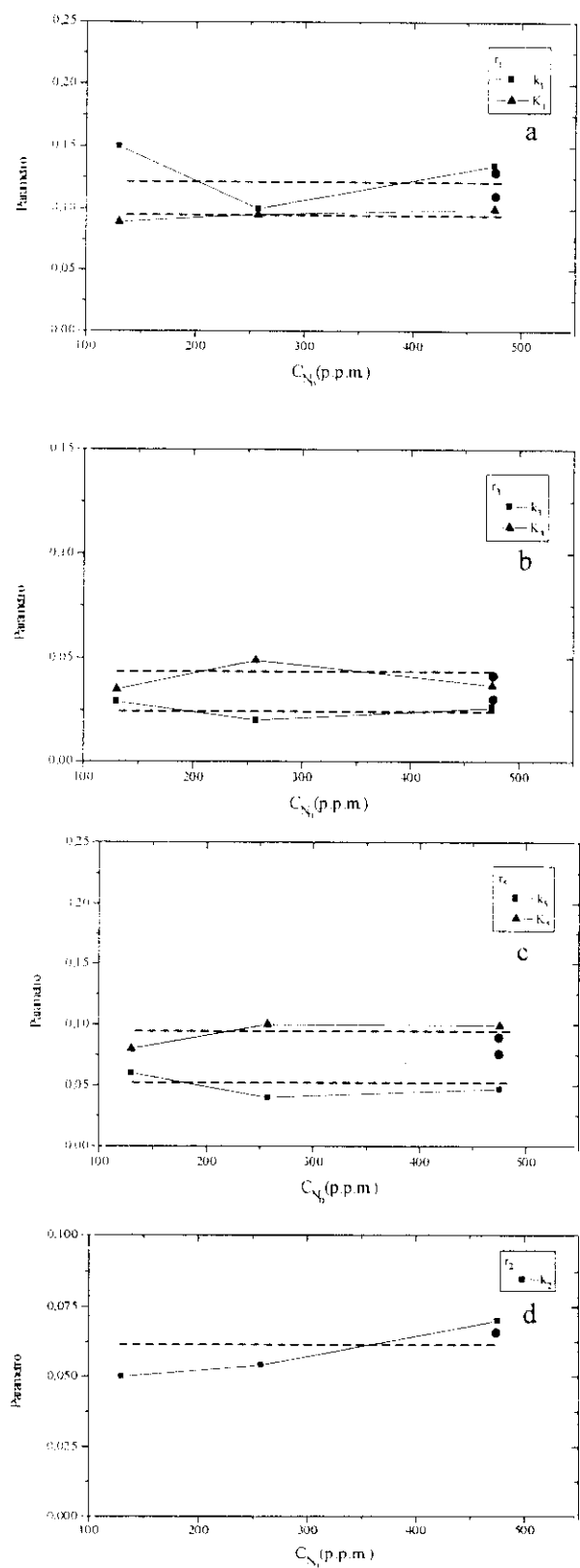


Figura 6.65.- Variación de los parámetros del modelo cinético de célula MCC-4 con la concentración inicial de amonio.
a) parámetro para la velocidad r_1 b) parámetro para la velocidad r_3
c) parámetro para la velocidad r_5 d) parámetro para la velocidad r_2

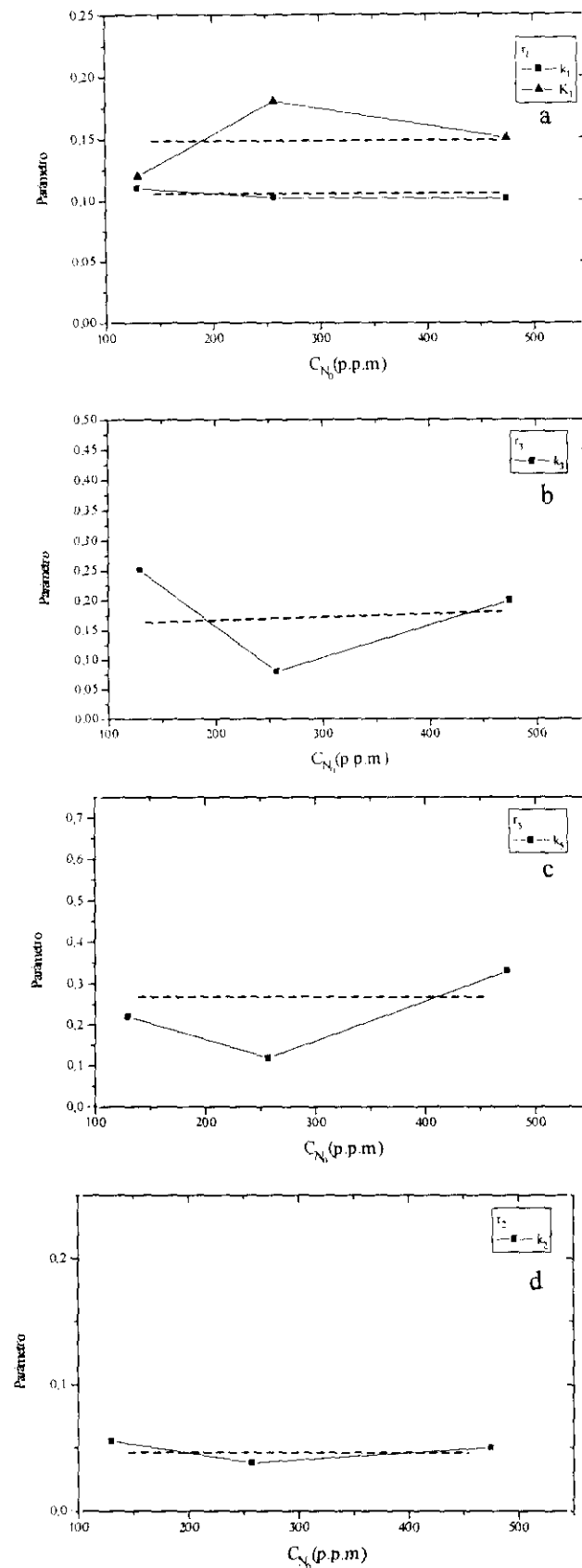


Figura 6.66.- Variación de los parámetros del modelo cinético de célula MCC-5 con la concentración inicial de amonio.

- a) parámetro para la velocidad r_1 b) parámetro para la velocidad r_3
 c) parámetro para la velocidad r_5 d) parámetro para la velocidad r_2

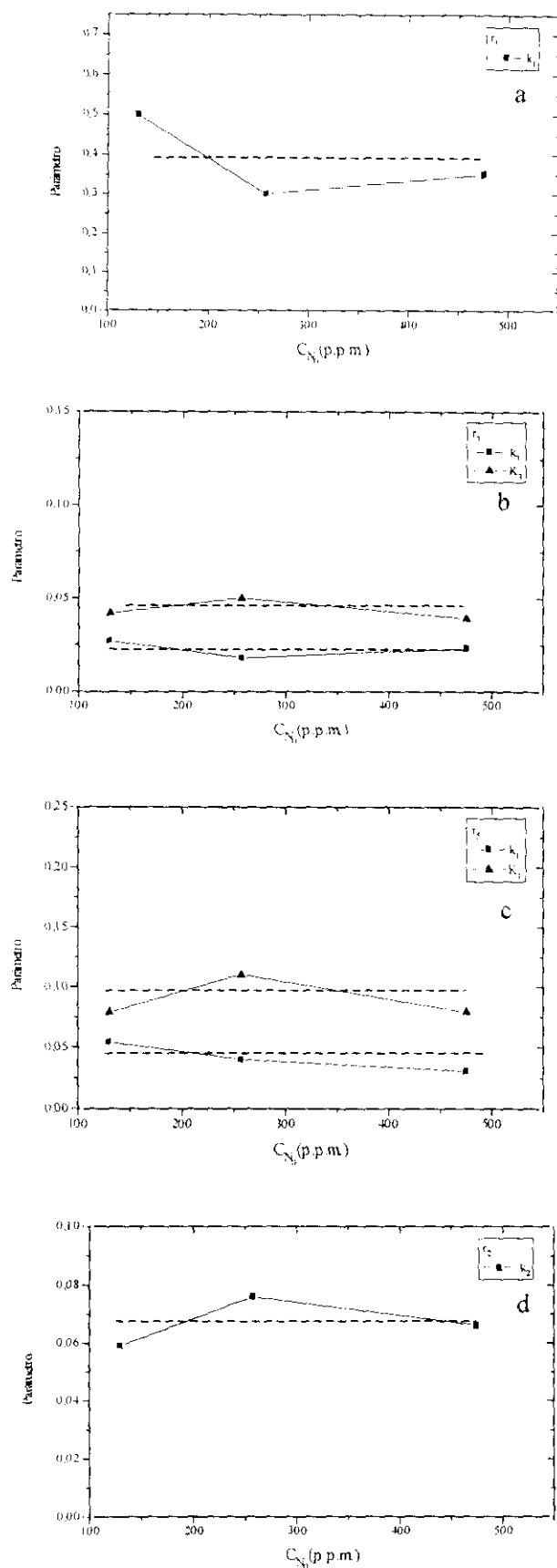


Figura 6.67.- Variación de los parámetros del modelo cinético de célula MCC-6 con la concentración inicial de amonio.

a) parámetro para la velocidad r_1

b) parámetros para la velocidad r_3

c) parámetros para la velocidad r_5

d) parámetro para la velocidad r_2

Al aplicar, por tanto, los diferentes criterios de discriminación sobre los cuatro modelos considerados, se concluye que los modelos MCC-3 y el MCC-4 parecen ser los que mejor resultado permiten obtener.

A pesar de que todos los modelos presentan una tendencia aceptable de los parámetros con las variables, hay que destacar que el MCC-6 presenta el parámetro correspondiente a r_2 con una tendencia con la temperatura que no parece muy clara. El MCC-5, en la variación de parámetros con el amonio presenta mínimos para r_3 y r_5 , lo cual no parece ser muy lógico.

Por tanto, la evolución de parámetros de los modelos MCC-5 y MCC-6 no parece aportar ninguna ventaja que permita considerar que estos modelos mejoran la reproducción de los datos experimentales respecto a los otros dos modelos planteados.

Hay que recordar que ambos modelos poseen un número más elevado de parámetros que el MCC-3, en cambio los valores de SRC eran mayores y, como se acaba de ver, la evolución de parámetros de estos modelos con las variables no es indicativa de que se mejore el resultado obtenido con MCC-3 y MCC-4.

En cuanto al MCC-3 y MCC-4, presentan una evolución razonable de todos sus parámetros con la temperatura y con el amonio. Por ello resulta más difícil discriminar entre ambos. No obstante, y como ya se comentó anteriormente, a pesar de que MCC-3 es el modelo que presenta menor número de parámetros es con el que se obtienen menores valores de SRC. Si bien este no es un criterio de discriminación muy claro, se va a utilizar para elegir el MCC-3 frente a los demás, debido a que es el modelo en el que el número de parámetros es menor (4 parámetros), lo cual simplifica mucho el problema, aspecto fundamental en ingeniería.

Por tanto, y debido a que se ha optado por el MCC-3, se pueden plantear ahora parámetros como funciones de la temperatura para este modelo. Las funciones se pueden obtener por observación de la forma de las curvas de la Figura 6.62; tanto k_3 como k_5 presentaban una tendencia constante con la variable, mientras que r_2 parece responder a una función tipo Ratkowsky, y r_1 una variación lineal descendente, de la siguiente forma:

$$k_1(T) = C_1 - C_2 \cdot T \quad [6.42]$$

$$k_3(T) = C_3 \quad [6.43]$$

$$k_5(T) = C_5 \quad [6.44]$$

$$r_2(T) = \{ C'_1 \cdot (T - T'_{min}) \cdot [1 - \exp(C'_2 \cdot (T - T'_{max}))] \}^2 \quad [6.45]$$

En cuanto al amonio, dada la tendencia constante de los parámetros como indica la Figura 6.65, no ha sido necesario plantear funciones de los parámetros en relación a esta variable.

6.2.5.- Mejora de las Deficiencias Observadas en el Modelo Cinético de Célula

A lo largo del apartado anterior se han ido exponiendo los resultados obtenidos al aplicar diferentes modelos para la descripción del crecimiento de *Xanthomonas campestris*. Se ha decidido discriminar el MCC-3 frente al resto de los modelos planteados, los cuales también permitían obtener buenos resultados en la reproducción de los datos experimentales.

También se comentó que el experimento llevado a cabo con una concentración inicial de amonio de 65 p.p.m.(experimento nº 5) no permitía una adecuada reproducción de los datos experimentales con ninguno de los modelos planteados. Por otro lado, el experimento realizado con 475 p.p.m. de amonio inicial se consigue con una reproducción aceptable, si bien no tan buena como la obtenida para el resto de experimentos realizados.

Por tanto, en este apartado se comentarán las deficiencias encontradas de la aplicación de los modelos cinéticos de célula, y cómo es posible realizar una mejora de estas deficiencias. Estas mejoras han sido comprobadas para los dos modelos que han proporcionado mejores resultados, esto es el MCC-4 y el MCC3.

•Mejora del ajuste del experimento n° 5 (28° C y 65 p.p.m. de amonio inicial)

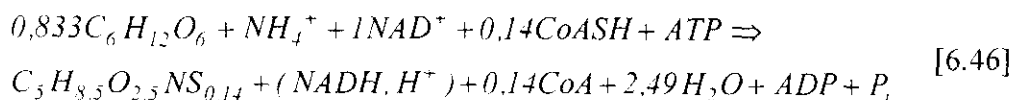
La principal deficiencia del modelo cinético de célula planteado es la encontrada para el experimento realizado con 65 p.p.m. de amonio inicial. Como se indicó al principio de este capítulo, al realizar el balance de nitrógeno con la estequiometría supuesta, no se podía cerrar el balance de este compuesto. Es decir, se encontró mayor concentración de nitrógeno en forma de componentes de la biomasa (DNA, RNA y proteínas) que la añadida como amonio en el medio de cultivo. Se puede pensar que la estequiometría considerada no sea la adecuada para este caso.

Es sabido que la composición de los microorganismos cambia con la composición del medio, de forma que la bacteria con concentraciones muy bajas de amonio puede estar produciendo componentes con diferente composición que cuando la concentración de amonio es más elevada.

Este cambio en la composición se reflejará en el tipo (y proporción) de aminoácidos para la formación de proteínas. Existen aminoácidos con un solo nitrógeno (el correspondiente al grupo amino del carbono α) y otros aminoácidos que poseen más de un nitrógeno (el del grupo amino del carbono α y con otro/s nitrógeno/s en la cadena lateral).

Es evidente que el microorganismo debe consumir más amonio cuando tenga que producir aminoácidos con más de un nitrógeno que cuando el aminoácido posea solo uno. Ante un cambio en la composición del medio, fundamentalmente en la fuente nitrogenada, el microorganismo formará aminoácidos de un tipo y de otro, pero no en la misma proporción. Debido a que no ha sido posible el análisis de dicha proporción entre los diferentes aminoácidos que constituyen la biomasa, pues se escapa al alcance de este trabajo, se ha realizado una suposición con el fin de verificar si este hecho puede explicar los resultados encontrados.

La suposición efectuada es que los **aminoácidos formados para la producción de proteínas**, en el experimento realizado con **65 p.p.m de amonio inicial**, son mayoritariamente aminoácidos con **un sólo nitrógeno**, por lo que la relación de filiación para los aminoácidos formadores de bases dada por la ecuación [6.15] viene dada ahora por la siguiente expresión:



En cuanto a las ecuaciones diferenciales para las velocidades de producción de cada uno de los componentes del sistema, la única que se ve modificada por el cambio efectuado en la estequiometría es la expresión dada por la ecuación [6.26], correspondiente a la velocidad de consumo de amonio, quedando ahora de la siguiente forma:

$$\frac{dC_{NH_4^+}}{dt} = 18 \cdot \left(-\left(\frac{r_1}{170,5}\right) - \left(\frac{r_2}{103,5}\right) - 2,75 \cdot \left(\frac{r_3}{491,16}\right) - 2,75 \cdot \left(\frac{r_4}{486,4}\right) \right) \quad [6.47]$$

El cambio en la estequiometría ha sido realizado en los dos modelos que daban mejores resultados, esto es para el MCC-3 y el MCC-4.

Al efectuar el ajuste en múltiple respuesta con este cambio y considerando las cinéticas planteadas para MCC-3, se obtienen los parámetros que aparecen en la Tabla 6.70, donde puede observarse que los valores estadísticos superan los valores teóricos de *t* de Student y *F* de Fischer con un 95 % de confianza. Además se obtienen valores de dichos parámetros superiores a los obtenidos con la estequiometría anterior. En la Figura 6.68 se muestra la reproducción de los datos experimentales con el MCC-3, modificado para este caso, observándose la clara mejora en la reproducción de los datos experimentales si se compara con lo observado anteriormente en la Figura 6.38.

Para el MCC-4, se obtienen resultados similares. En la Tabla 6.71 se muestran los valores de los parámetros así como las estadísticas obtenidas del ajuste al modelo, observándose que se superan en todos los casos los valores teóricos de *t* de Student y de la *F* de Fischer. En la Figura 6.69 se muestra la buena reproducción de los datos experimentales con el MCC-4 modificado en comparación a lo observado, para este mismo modelo en la Figura 6.45.

Tabla 6.70.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del experimento n° 2. Condiciones experimentales: $T=28^{\circ}\text{C}$, $C_N=65$ p.p.m de amonio, $N=$ variable (210 r.p.m. inicial), al MCC-3

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k ₁	0,60	0,59	0,58	7,1.10 ²	2430
k ₃	0,161	0,158	0,155	7,1.10 ³	
k ₅	0,23	0,25	0,24	9,8.10 ³	
k ₂	0,051	0,05	0,049	7,3.10 ³	
t de Student (95% confianza)= 2,080 F de Fischer (95% de confianza)= 2,49			SRC= 0,025		

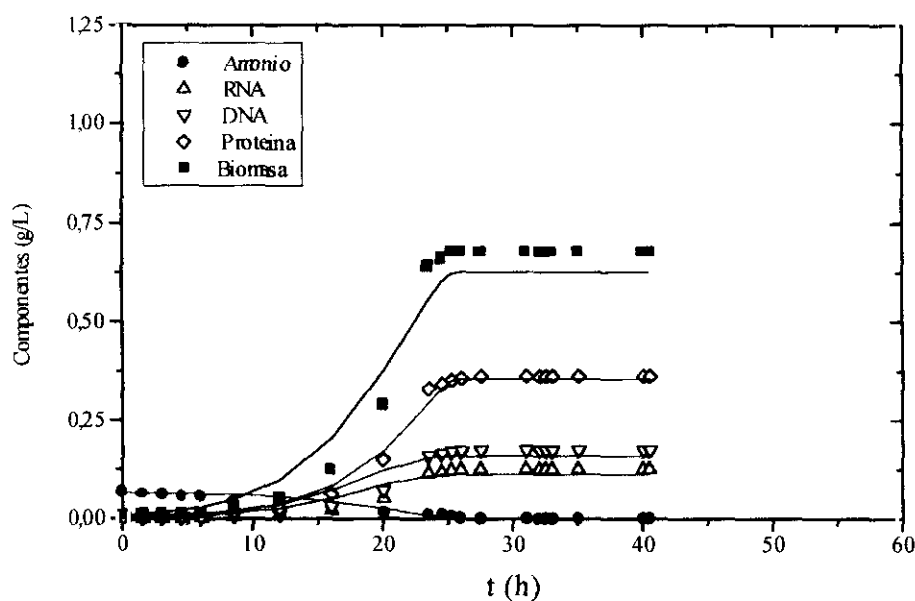


Figura 6.68.- Evoluciones de los componentes del sistema obtenidos por ajuste del experimento n° 5 (28°C y 65 p.p.m. de amonio inicial) al modelo MCC-3, con cambio en la estequiometría de los componentes.

Tabla 6.71.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del experimento nº 2.
Condiciones experimentales: T=28° C, C_N=65 p.p.m de amonio, N= variable (210 r.p.m. inicial), al MCC-4.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k ₁	0,089	0,088	0,088	7,1.10 ⁴	4430
K ₁	0,014	0,013	0,012	5,3.10 ⁵	
k ₃	0,083	0,082	0,081	9,1.10 ⁴	
K ₃	0,052	0,052	0,052	8,5.10 ⁴	
k ₅	0,171	0,17	0,169	6,2.10 ⁴	
K ₅	0,095	0,095	0,095	9,1.10 ⁴	
k ₂	0,013	0,013	0,013	6,23.10 ⁴	
t de Student (95% confianza)= 2,080 F de Fischer (95% de confianza)= 2,49			SRC= 0,012		

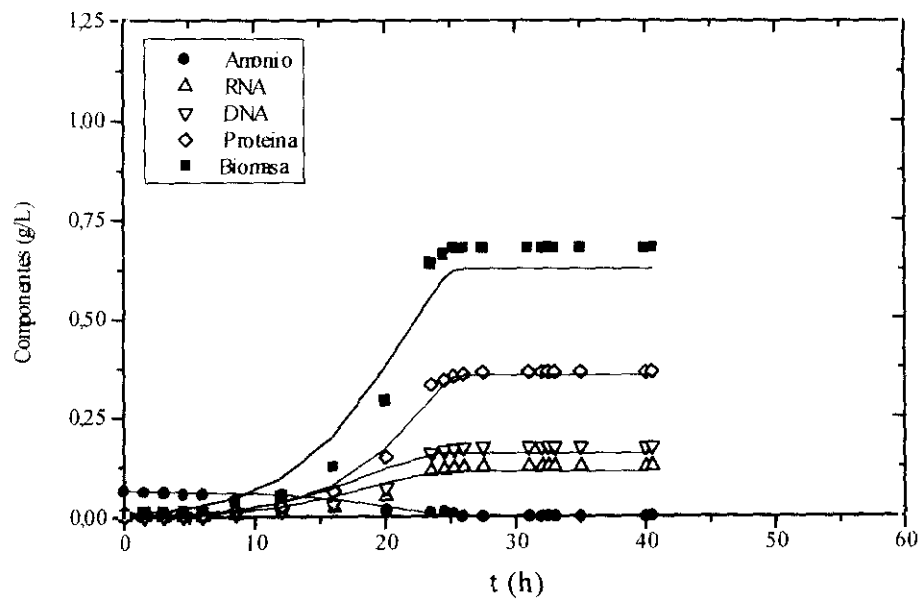


Figura 6.69.- Evoluciones de los componentes del sistema obtenidos por ajuste del experimento nº 5 (28 °C y 65 p.p.m. de amonio inicial) al modelo MCC-4 con cambio en la estequiometría de los componentes.

•Mejora del ajuste del experimento n° 7 (28° C y 475 p.p.m. de amonio inicial)

Como ya ha sido expuesto anteriormente, para el experimento realizado con una concentración inicial de amonio de 475 p.p.m., se obtenían valores estadísticos significativamente buenos de los parámetros y una aceptable reproducción de los datos experimentales con los modelos MCC-3 y MCC-4, esto es, los que parece que mejor describen el crecimiento de la bacteria. No obstante, si comparamos las reproducciones obtenidas por ajuste a los citados modelos con las obtenidas para el resto de experimentos, se puede observar que la reproducción de los datos experimentales de este experimento es significativamente peor.

Una explicación a lo observado, podría ser el efecto tóxico del amonio para el crecimiento del microorganismo a partir de cierta concentración. En la literatura aparecen referencias sobre el efecto tóxico de este compuesto en el crecimiento de microorganismos (Cid y col., 1996).

La inhibición del crecimiento del microorganismo por la presencia de alguna sustancia –que puede ser sustrato o producto- en cierta cantidad, ha sido considerada por muchos autores, pero la expresión más común de inhibición por sustrato, es la propuesta por Wayman y Tseng (1976). Estos autores consideran que existe una concentración crítica del sustrato (C_{Sc}), por debajo de la cual no produce inhibición del crecimiento, empleando la expresión:

$$\frac{dC_x}{dt} = \frac{\mu_m \cdot C_s}{K_s + C_s} \cdot C_x \quad \therefore C_s \leq C_{Sc} \quad [6.48]$$

$$\frac{dC_x}{dt} = \left[\frac{\mu_m \cdot C_s}{K_s + C_s} - k_i \cdot (C_s - C_{Sc}) \right] \cdot C_x \quad \therefore C_s \leq C_{Sc} \quad [6.49]$$

Para el caso concreto del experimento realizado a 475 p.p.m. se ha tomado el término de inhibición de la ecuación [6.49] y se ha incluido en la expresión dada por la ecuación [6.30] correspondiente al término de aminoácidos no formadores de bases, es decir aquellos que formarán parte de las proteínas, las cuales formarán parte a su vez de la propia biomasa, quedando la expresión siguiente:

$$\frac{dC_{PRI}}{dt} = (r_I - C_{PRE}) - k_I \cdot (C_N - C_{NC}) \quad [6.50]$$

La concentración de sustrato nitrogenado crítica (C_{NC}), no se conoce en este caso, pero para comprobar este efecto inhibitorio se ha supuesto que este valor es de 350 p.p.m de amonio.

Se ha realizado el ajuste de los datos experimentales con el modelo MCC-3 teniendo en cuenta esta modificación. Los parámetros obtenidos se muestran en la Tabla 6.72, donde se observa, además, el valor del nuevo parámetro considerado, k_I que es la constante de inhibición por amonio. Los valores estadísticos de los parámetros superan los valores teóricos de t de Student y F de Fischer. En la Figura 6.70 se muestra la reproducción de las velocidades de los componentes del sistema. Si se compara con la Figura 6.40, correspondiente al ajuste de este mismo experimento con el MCC-3, se observa la clara mejora obtenida al considerar el término de inhibición.

Para el ajuste con el modelo MCC-4, los valores de los parámetros obtenidos se muestran en la Tabla 6.73. Los valores estadísticos de los parámetros superan los teóricos de la t de Student y de la F de Fischer. La Figura 6.71 muestra de nuevo la clara mejoría en la reproducción de los datos experimentales al incluir el término de inhibición por sustrato, al comparar con la Figura 6.47 correspondiente al ajuste realizado con este mismo modelo (MCC-4) sin considerar la inhibición por sustrato. Además se consigue un significativo descenso del valor de SRC.

La tendencia de los nuevos parámetros obtenidos al considerar el término de inhibición en función de la variable concentración de amonio inicial se muestran en las Figuras 6.64 y 6.65, donde aparece representado este valor indicado por un punto. Ambas Figuras corresponden a la tendencia de los parámetros obtenidos por ajuste de los experimentos realizados con diferentes concentraciones iniciales de amonio, al MCC-3 y al MCC-4, y como se puede comprobar, dicha tendencia no cambia cuando se incluye este nuevo término al modelo para el experimento realizado con 475 p.p.m..

Tabla 6.72.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del experimento n° 7. Condiciones experimentales: $T=28^{\circ}\text{C}$, $C_N=475$ p.p.m de amonio, $N=$ variable (210 r.p.m. inicial), al modelo MCC-3 con término de Inhibición.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k ₁	0,53	0,52	0,51	2,1.10 ⁵	4635,3
k ₃	0,154	0,15	0,147	8,2.10 ³	
k ₅	0,22	0,19	0,16	5,2.10 ²	
k ₂	0,055	0,05	0,045	9,3.10 ²	
k _i	0,081	0,08	0,079	8.10 ³	
t de Student (95% confianza)= 2,080 F de Fischer (95% de confianza)= 2,49			SRC= 0,05		

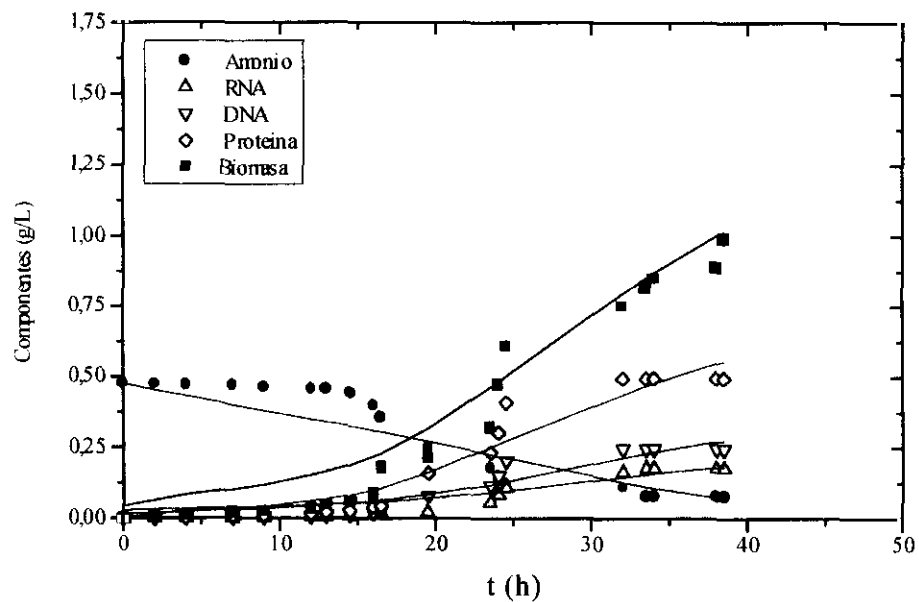


Figura 6.70.- Evoluciones de los componentes del sistema obtenidos por ajuste del experimento n° 7 (28°C y 475 p.p.m. de amonio inicial) al modelo MCC4, con término de inhibición.

Tabla 6.73.- Parámetros calculados por ajuste de los datos del **experimento n° 7**.
Condiciones experimentales: **T=28° C**, **C_N=475 p.p.m** de amonio, **N= variable (210 r.p.m. inicial)**, al modelo **MCC-4** con término de inhibición.

Parámetro	Valores de los parámetros			t Student	F Fischer
	Máx	Ópt	Mín		
k ₁	0,122	0,121	0,12	5,1.10 ⁴	5635,3
K ₁	0,102	0,101	0,10	7,1.10 ⁴	
k ₃	0,022	0,020	0,018	3,1.10 ⁴	
K ₃	0,045	0,045	0,045	5,2.10 ⁴	
k ₅	0,08	0,08	0,08	9,2.10 ⁴	
K ₅	0,082	0,078	0,074	3,1.10 ⁴	
k ₂	-	0,05	-	9,23.10 ⁴	
k _i	0,067	0,067	0,067	9,510 ⁵	
				SRC= 0,042	

t de Student (95% confianza)= 2,93
F de Fischer (95% de confianza)= 2,54

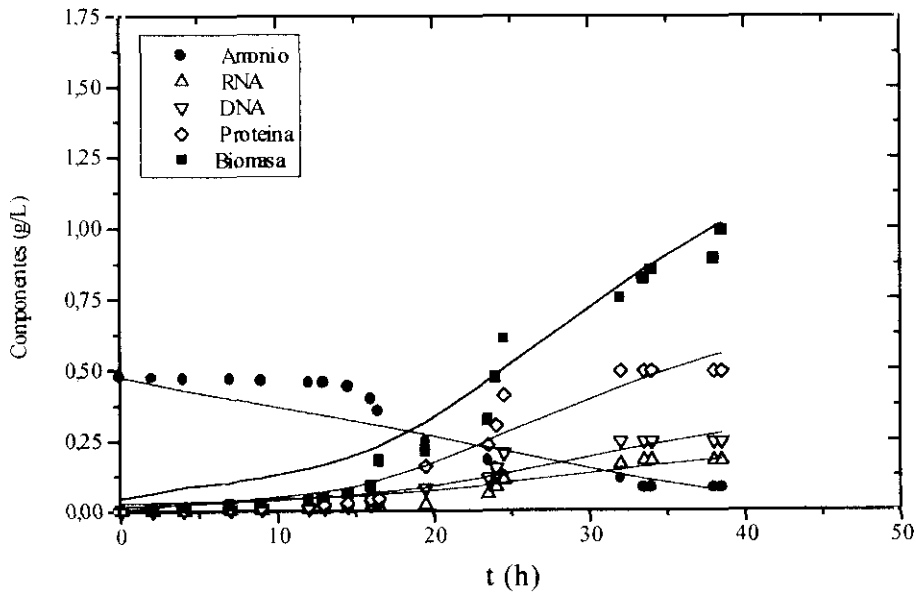


Figura 6.71.- Evoluciones de los componentes del sistema obtenidos por ajuste del **experimento n° 7** (28 °C y 475 p.p.m. de amonio inicial) al modelo **MCC4**, con término de inhibición.

A lo largo de este capítulo se ha ido desarrollando el planteamiento y ajuste a datos experimentales de un **Modelo Cinético de Célula** para la descripción del crecimiento del microorganismo objeto de estudio, esto es la bacteria *Xanthomonas campestris*. De la aplicación de toda la metodología desarrollada en este capítulo, se ha llegado a dos modelos que son capaces de describir adecuadamente el crecimiento del microorganismo, no observándose, en principio, diferencias significativas entre ambos.

Se va ahora a unir este modelo de célula, con la parte correspondiente a la producción del polisacárido. Concretamente se ha elegido el MCC-3 para realizar la última etapa de este trabajo de investigación. De acuerdo a los criterios de discriminación indicados anteriormente.

Es necesario ahora **unir** este **modelo de célula** -el cual permite predecir cambios en la composición del medio considerando el metabolismo del nitrógeno estructurado en la biomasa (DNA, RNA y proteínas)- con el **modelo cinético metabólico**, el cual aportó resultados muy buenos para la parte correspondiente a producción del polisacárido, tal como se vió en el Capítulo 5 de la presente Memoria.

Por tanto, en el próximo Capítulo se abordará el planteamiento de un modelo **Químicamente Estructurado para la Producción de Xantano**, el cual será realizado como suma de los dos modelos comentados: el **Modelo Cinético de Célula** y el **Modelo Cinético Metabólico**.

7.- MODELO CINÉTICO

QUÍMICAMENTE ESTRUCTURADO

7.- MODELO CINÉTICO QUÍMICAMENTE ESTRUCTURADO

Los Modelos Químicamente Estructurados describen el metabolismo como una red de reacciones, empleando para ello esquemas simplificados de reacción, de la misma manera que en los modelos metabólicos y en los modelos de célula ya descritos anteriormente.

Un modelo de este tipo se puede plantear mediante la unión de **modelos metabólicos** en los que se describe la producción de un producto de interés considerando estructuración del sustrato carbonado, dentro de la red simplificada de rutas metabólicas-, con **modelos cinéticos de célula-** que describen el crecimiento del microorganismo considerando la estructuración del sustrato nitrogenado, dentro de la red simplificada del metabolismo del microorganismo productor-.

Los modelos más complejos vistos hasta ahora han sido los **modelos de célula**, con los que podía realizarse una buena descripción del crecimiento del microorganismo teniendo en cuenta la evolución de una serie de componentes intracelulares que constituyen la biomasa del mismo. En la literatura existe escasa información sobre este tipo de modelos, solo se han realizado intentos por describir el crecimiento utilizando estos modelos sobre sistemas muy conocidos como *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis* y, en ningún caso, sobre microorganismos de interés industrial.

Por esta razón, es necesaria la propuesta de los modelos químicamente estructurados, es decir, que consideren por un lado los principios del modelo de célula, pero además los del modelo metabólico tratando de hacer posible la descripción de una producción de interés industrial y, con ello, utilizar la información en el cambio de escala del proceso.

A pesar de las grandes ventajas que pueden ofrecer los modelos químicamente estructurados, no existe en la literatura ningún precedente en la línea indicada. La modelización más compleja vista hasta ahora se ha quedado al nivel de modelos de célula, donde tampoco existen muchos trabajos, y donde se realiza únicamente, como ya se ha comentado, la estimación de parámetros sin ajuste de datos experimentales.

En el capítulo 5 de la presente memoria se aplicó un **modelo cinético metabólico** para la descripción de la **producción de xantano**. En este modelo se estructuró el metabolismo del sustrato carbonado, sin diferenciar partes de la biomasa, ya que ésta era descrita mediante la ecuación logística, es decir, se consideraba no estructurada. Como ya fue comentado, los resultados obtenidos con este modelo fueron significativamente buenos para la descripción de los componentes del sistema, como xantano, fuente carbonada (sacarosa) y oxígeno disuelto. Además se planteó un modelo en función de una de las variables estudiada, esto es la temperatura. Las ecuaciones para las velocidades de producción, las ecuaciones cinéticas para este modelo, junto con el valor de los parámetros obtenidos se muestran en la Tabla 7.1.

Por otro lado, en el capítulo anterior se planteó un modelo más complejo para el crecimiento del microorganismo, dado que su descripción había sido realizada hasta ahora solo de forma no estructurada. Se trata ahora de estructurar el metabolismo del sustrato nitrogenado para la descripción de la parte correspondiente al crecimiento del microorganismo, uniéndolo, en este caso, con el metabolismo correspondiente a la producción. Del planteamiento y posterior aplicación del **modelo cinético de célula**, se obtuvo un modelo cuyos parámetros pudieron ser puestos en función de la variable temperatura, pero además no variaban con relación al nitrógeno inicial puesto en el experimento; con lo que este modelo permite la predicción de cambios en el sistema frente a cambios en la composición del medio de cultivo, algo sin precedentes en la literatura, como ya se ha explicado. Las velocidades de producción de los componentes del sistema junto con las ecuaciones cinéticas de este modelo cinético vienen dadas por las ecuaciones de la Tabla 7.2.

Tabla 7.1. Ecuaciones correspondientes al Modelo Cinético Metabólico planteado para la descripción de la producción de xantano.

MODELO CINÉTICO METABÓLICO	
Velocidades de Producción	<p>Para la biomasa:</p> $\frac{dC_X}{dt} = k_x \cdot \left(\frac{C_{X0}}{Y_{XN}} + C_{N0} \right) \cdot C_X \cdot \left(1 - \frac{C_X}{C_{X0} + Y_{XN} \cdot C_{N0}} \right) \quad [7.1]$
	<p>Para el azúcar:</p> $\frac{dC_S}{dt} = 180 \cdot \left\{ -\frac{5,94}{923,2} \cdot \frac{dC_P}{dt} - \frac{1}{12} \cdot \frac{k_4 \cdot C_{O_2}}{K_4 + C_{O_2}} \cdot C_X \cdot \left[1 - 3,58 \cdot \left(\frac{1 + 4 \cdot Y_{rp}}{3,58 + 4 \cdot Y_{ATPP}} \right) \right] \right. \\ \left. - \frac{1}{Y_{XS}} \cdot \frac{dC_X}{dt} \right\} \quad [7.2]$
	<p>Para el producto:</p> $\frac{dC_P}{dt} = 923,2 \cdot \frac{k_4 \cdot C_{O_2}}{K_4 + C_{O_2}} \cdot \left(\frac{1 + 4 \cdot Y_{rp}}{3,58 + 4 \cdot Y_{ATPP}} \right) \cdot C_X \quad [7.3]$
	<p>Para la evolución de oxígeno disuelto:</p> $\frac{dC_{O_2}}{dt} = -\frac{0,3}{923,2} \cdot \frac{dC_P}{dt} - 0,5 \cdot \frac{k_4 \cdot C_{O_2}}{K_4 + C_{O_2}} \cdot C_X + k_{LaV} \cdot (C^* - C_{O_2}) - \frac{1}{Y_{OX}} \cdot \frac{dC_X}{dt} \quad [7.4]$
Ecuaciones Cinéticas	$r_x = k_x \cdot \left(\frac{C_{X0}}{Y_{XN}} + C_{N0} \right) \cdot C_X \cdot \left(1 - \frac{C_X}{C_{X0} + Y_{XN} \cdot C_{N0}} \right) \quad [7.5]$
	$r_4 = \frac{k_4 \cdot C_{O_2}}{K_4 + C_{O_2}} \cdot C_X \cdot \left(\frac{1 + 4 \cdot Y_{rp}}{3,58 + 4 \cdot Y_{ATP}} \right) \quad [7.6]$
	$r_2 = \frac{1}{12} \cdot \frac{k_4 \cdot C_{O_2}}{K_4 + C_{O_2}} \cdot C_X \cdot \left(1 - 3,58 \cdot \left(\frac{1 + 4 \cdot Y_{rp}}{3,58 + 4 \cdot Y_{ATPP}} \right) \right) \quad [7.7]$
	$Y_{rp} = 1,2 \cdot \frac{C_{O_2}}{K_4 + C_{O_2}} \quad [7.8]$
	$Y_{ATPP} \approx 34 \quad [7.9]$
Parámetros con la Temperatura	$k(T) = \{ 0,94 \cdot (T - 19,45) \cdot [1 - \exp(1,399 \cdot (T - 34,24))] \}^2 \quad [7.10]$
	$k'(T) = -2,913 + 2,048 \cdot T \quad [7.11]$
	$Y_{OX}(T) = \{ 0,597 \cdot (T - 24,35) \cdot [1 - \exp(-0,205 \cdot (T - 37,16))] \}^2 \quad [7.12]$
	$Y_{XS}(T) = 0,340 + (-6,1 \cdot 10^{-3}) \cdot T \quad [7.13]$

Tabla 7.2. Ecuaciones correspondientes al Modelo Cinético Metabólico planteado para la descripción de la producción de xantano.

MODELO CINÉTICO de CÉLULA	
Velocidades de Producción	Para la biomasa : $\frac{dC_X}{dt} = \frac{dC_{RNA}}{dt} + \frac{dC_{DNA}}{dt} + \frac{dC_{PRI}}{dt}$ [7.14]
	RNA $\frac{dC_{RNA}}{dt} = r_3$ [7.15]
	DNA $\frac{dC_{DNA}}{dt} = r_5$ [7.16]
	Proteínas intracelulares $\frac{dC_{PRI}}{dt} = r_1 - \frac{dC_{PRE}}{dt}$ [7.17]
	Para el amonio : $\frac{dC_{NH_4^+}}{dt} = 18 \cdot (-1,4 \cdot \frac{r_1}{136,5} - \frac{r_2}{103,5} - 2,75 \cdot \frac{r_3}{478,6} - 2,75 \cdot \frac{r_5}{491,7})$ [7.18]
Ecuaciones Cinéticas	$r_1 = k_1 \cdot C_N \cdot C_X$ [7.19]
	$r_3 = k_3 \cdot C_N \cdot C_X$ [7.20]
	$r_5 = k_5 \cdot C_N \cdot C_X$ [7.21]
	$r_{2m} = k_2 \cdot C_N$ [7.22]
Parámetros con la Temperatura	$k_1(T) = 1,49 - 0,036 \cdot T$ [7.23]
	$k_3(T) = 0,150$ [7.24]
	$k_5(T) = 0,198$ [7.25]
	$k_2(T) = \{ 0,041 \cdot (T - 21) \cdot [1 - \exp(0,352 \cdot (T - 35,08))] \}^2$ [7.26]

7.1.- PLANTEAMIENTO DEL MODELO

Se trata ahora de plantear un Modelo Químicamente Estructurado (MQE) que, como ya se ha indicado, se va hacer como suma de un modelo cinético metabólico y de un modelo cinético de célula.

Se realizará, por tanto, la unión de los dos modelos de este tipo que ya han sido aplicados en el presente trabajo. Al unir ambos modelos, la parte correspondiente a biomasa del modelo metabólico (ecuación [7.1]) queda ahora desglosada en las expresiones del modelo cinético de célula (ecuaciones [7.14] a [7.17]). Además, es necesario cambiar el término correspondiente al rendimiento de azúcar en biomasa (Y_{XS}) de la ecuación [7.2], que debe ser ahora desglosado en los términos correspondientes al azúcar que va a parar a biomasa, de acuerdo a las relaciones estequiométricas entre el azúcar y los componentes del sistema, vistas en el capítulo anterior (ecuaciones [6.15] a [6.19]), los cambios se destacan en **negrita**:

$$\begin{aligned} \frac{dC_S}{dt} = & 180 \cdot \left(-\frac{5,94}{923,2} \cdot \frac{dC_P}{dt} - \frac{1}{12} \cdot \frac{k_4 \cdot C_{O_2}}{K_4 + C_{O_2}} \cdot C_X \cdot \left[1 - 3,58 \cdot \left(\frac{1 + 4 \cdot Y_{rp}}{3,58 + 4 \cdot Y_{ATPP}} \right) \right] \right. \\ & \left. - 0,933 \left(\frac{r_1}{136,5} \right) - 0,5 \cdot \left(\frac{r_2}{103,5} \right) - 1,08 \cdot \left(\frac{r_3}{491,87} \right) - 1,12 \cdot \left(\frac{r_5}{486,7} \right) \right) \end{aligned} \quad [7.27]$$

De esta forma, el modelo químicamente estructurado propuesto para la producción de xantano consta de 7 respuestas: las correspondientes a la biomasa, es decir, DNA, RNA, proteínas intracelulares, la correspondiente al nitrógeno y las de la parte de producción, es decir xantano, sustrato carbonado y oxígeno disuelto. Incorporando las ecuaciones cinéticas propuestas en anteriores capítulos, el modelo propuesto consta de 18 parámetros, tal como ha sido indicado en las tablas anteriores.

En este caso, no se va a realizar el cálculo de los parámetros por ajuste de datos experimentales debido a que este modelo cinético es, en realidad, la suma de los dos modelos citados, cuyos valores de parámetros ya habían sido obtenidos por ajuste de datos experimentales. Por otro lado, el abordaje matemático de un modelo de este tipo, con tan elevado número de parámetros, sería muy complejo.

Por tanto, se van a emplear los parámetros obtenidos de cada uno de los modelos, con el fin de observar si el Modelo Cinético Químicamente Estructurado planteado es capaz de reproducir los resultados experimentales de cada uno de los experimentos llevados a cabo en este trabajo. En la Tabla 7.3 aparecen las ecuaciones con el valor de los parámetros del modelo en función de la temperatura.

Tabla 7.3.- Valor de los parámetros en función de la temperatura empleados para el Modelo Químicamente Estructurado.

$k(T) = \{ 0,94 \cdot (T - 19,45) \cdot [1 - \exp(1,399 \cdot (T - 34,24))] \}^2$	[7.28]
$k'(T) = -2,913 + 2,048 \cdot T$	[7.29]
$Y_{Ox}(T) = \{ 0,597 \cdot (T - 24,35) \cdot [1 - \exp(-0,205 \cdot (T - 37,16))] \}^2$	[7.30]
$Y_{Xs}(T) = 0,340 + (-6,1 \cdot 10^{-3}) \cdot T$	[7.31]
$k_1(T) = 1,49 - 0,036 \cdot T$	[7.32]
$k_3(T) = 0,150$	[7.33]
$k_5(T) = 0,198$	[7.34]
$k_2(T) = \{ 0,041 \cdot (T - 21) \cdot [1 - \exp(0,352 \cdot (T - 35,08))] \}^2$	[7.35]

7.2.- APLICACIÓN DEL MODELO CON DATOS EXPERIMENTALES

Para aplicar este modelo, se ha realizado la reproducción de los datos experimento a experimento, empleando los parámetros indicados, y se han comparado tanto con los resultados experimentales como con la reproducción obtenida por el modelo metabólico, con el fin de observar qué mejoras puede aportar el Modelo Cinético Químicamente Estructurado.

En las Figuras 7.1 y 7.2 se muestran los resultados de las reproducciones con ambos modelos para el **experimento nº 1**, llevado a cabo a **25° C y con 257 p.p.m. de amonio inicial**. En la Figura 7.1 se comparan estos resultados para la evolución de la biomasa y de amonio. Se puede apreciar que el MQE (línea continua) predice una concentración de biomasa en la fase estacionaria algo inferior a la obtenida con el MMET. Además, se observa la clara mejoría que introduce el MQE en la reproducción de la evolución de amonio. En la Figura 7.2 aparece la reproducción con ambos modelos de la velocidad de formación de xantano, de consumo de azúcar y evolución de oxígeno disuelto. En la citada figura se puede ver que el MQE predice una concentración de xantano inferior a la que predice el MMET, con lo que se explica la menor velocidad de consumo de azúcar y oxígeno con este modelo en comparación con el modelo metabólico. Estas diferencias son seguramente debidas a la inferior cantidad de biomasa que predice el MQE.

En las Figuras 7.3 y 7.4 se muestran estos mismos resultados para el **experimento nº 2**, realizado a **28° C y con 257 p.p.m. de amonio inicial**. En la Figura 7.3 se observa que MQE (línea continua), de nuevo, predice una concentración de biomasa en la fase estacionaria de crecimiento algo inferior a la obtenida con el MMET, no siendo así durante la fase exponencial. Además se observa la mejor reproducción de la evolución de amonio introducida por el MQE. En la Figura 7.4 aparece la reproducción con ambos modelos de la velocidad de formación de xantano, de consumo de azúcar y la evolución de oxígeno disuelto. El MQE predice también en este caso una concentración de xantano más baja que la que se obtiene con el MMET y, en consecuencia, una menor velocidad de consumo de azúcar y oxígeno.

Las Figuras 7.5 y 7.6 muestran las reproducciones de los datos experimentales obtenidas con ambos modelos comentados, para el **experimento n° 3**, llevado a cabo a **31° C** y con **257 p.p.m. de amonio inicial**. Los resultados obtenidos para la biomasa y la evolución de amonio aparecen en la Figura 7.5. En este caso las diferencias entre ambas velocidades de formación de biomasa no son muy significativas, si bien es ligeramente mayor la concentración de la biomasa que predice el MMET. Además, se observa la clara mejoría que introduce el MQE en la reproducción de la evolución de amonio. En la Figura 7.6 aparece la reproducción con ambos modelos de la velocidad de formación de xantano, de consumo de azúcar y evolución de oxígeno disuelto. En la citada figura se puede ver que la evolución de los componentes citados es muy similar, siendo ligeramente inferior la velocidad de formación de xantano en el MQE.

En las Figuras 7.7 y 7.8 se muestran estos mismos resultados con el **experimento n° 4**, llevado a cabo a **34° C** y con **257 p.p.m. de amonio inicial**. En la Figura 7.7 se puede ver que no hay diferencias significativas en la evolución de biomasa que predicen ambos modelos; sin embargo, hay cierta diferencia, como se ha ido viendo, en la reproducción de la evolución de amonio introducida por el MQE. En la Figura 7.8 aparece la reproducción con ambos modelos de la velocidad de formación de xantano, de consumo de azúcar y la evolución de oxígeno disuelto. Se puede apreciar que apenas hay diferencias en la evolución de estos componentes en los dos modelos que se están comparando.

En las Figuras 7.9 y 7.10 se muestran las reproducciones de los datos experimentales para el **experimento n° 5**, realizado a **28° C** y con **65 p.p.m. de amonio inicial**. Hay que destacar que, en este caso, se emplea el cambio de estequiometría para el amonio (ecuación [6.47]), que ya fue visto en el capítulo anterior. En la Figura 7.9 se observa que la biomasa obtenida con el MQE es significativamente menor que la obtenida con el MMET. En la Figura 7.10 aparece la reproducción con ambos modelos de la velocidad de formación de xantano, de consumo de azúcar y la evolución de oxígeno disuelto, observándose que también la producción de xantano es menor en el caso del MQE que en el MMET, lo que de nuevo parece relacionado con la infraestimación de biomasa.

En las Figuras 7.11 y 7.12 se muestran las reproducciones de los datos experimentales para el **experimento n° 6**, llevado a cabo a **28° C** y con **130 p.p.m. de amonio inicial**. En la Figura 7.11 se observa que apenas hay diferencia entre la evolución de biomasa obtenida por el MQE y la obtenida con el MMET, si bien, en este caso, la concentración de biomasa en la fase estacionaria de crecimiento obtenida con el MQE es mayor que con el modelo metabólico. En la Figura 7.12 aparece la reproducción con ambos modelos de la velocidad de formación de xantano, de consumo de azúcar y la evolución de oxígeno disuelto, observándose que no hay diferencias destacables.

En las Figuras 7.13 y 7.14 se muestran estos mismos resultados para el **experimento n° 7**, llevado a cabo a **28° C** y con **475 p.p.m. de amonio inicial**. En este caso, el ajuste es realizado con el MCC-3 modificado, es decir, el que tiene en cuenta el término de inhibición del crecimiento con esta concentración de sustrato nitrogenado. En la Figura 7.13 se observa que MQE (línea continua) predice una concentración de biomasa en la fase estacionaria de crecimiento algo inferior a la obtenida con el MMET. Además se observa, de nuevo, la mejor reproducción de la evolución de amonio con el MQE. En la Figura 7.14 se ha representado la reproducción con ambos modelos de la velocidad de formación de xantano, de consumo de azúcar y la evolución de oxígeno disuelto. El MQE predice también en este caso una concentración de xantano más baja a la que se obtiene con el MMET y, en consecuencia, una menor velocidad de consumo de azúcar y oxígeno.

Si bien las diferencias en las reproducciones de los datos de cada uno de los experimentos no son muy significativas, se observa que el modelo químicamente estructurado predice, salvo en el experimento n° 6, una menor concentración del polisacárido. Esto parece ser debido a que la biomasa que predice el MQE es también inferior a la que predice el MEM y a la obtenida experimentalmente. Como ya se ha visto, la curva de evolución de biomasa obtenida con el Modelo Cinético Químicamente Estructurado es, en casi todos los experimentos, inferior a la obtenida con el Modelo Cinético Metabólico. Esta pequeña diferencia en la biomasa es la que provoca, por tanto, la diferencia en la predicción de algunos otros componentes (xantano y azúcar) en la parte correspondiente a la producción.

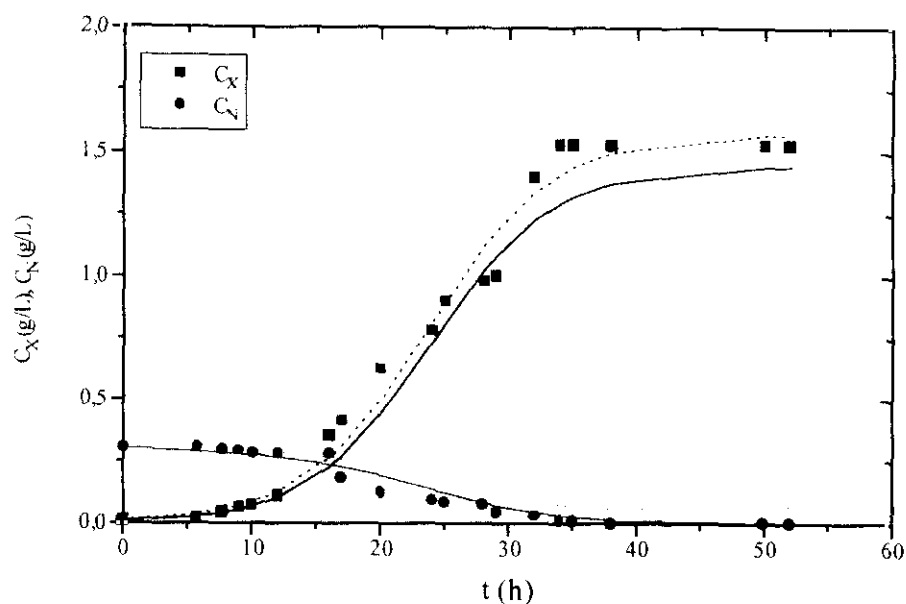


Figura 7.1- Comparación de la reproducción de la evolución de biomasa y amonio del experimento n° 1 (25 °C y 257 p.p.m. de amonio inicial) entre el Modelo Cinético Metabólico (línea discontinua) y el Modelo Cinético Químicamente Estructurado (línea continua).

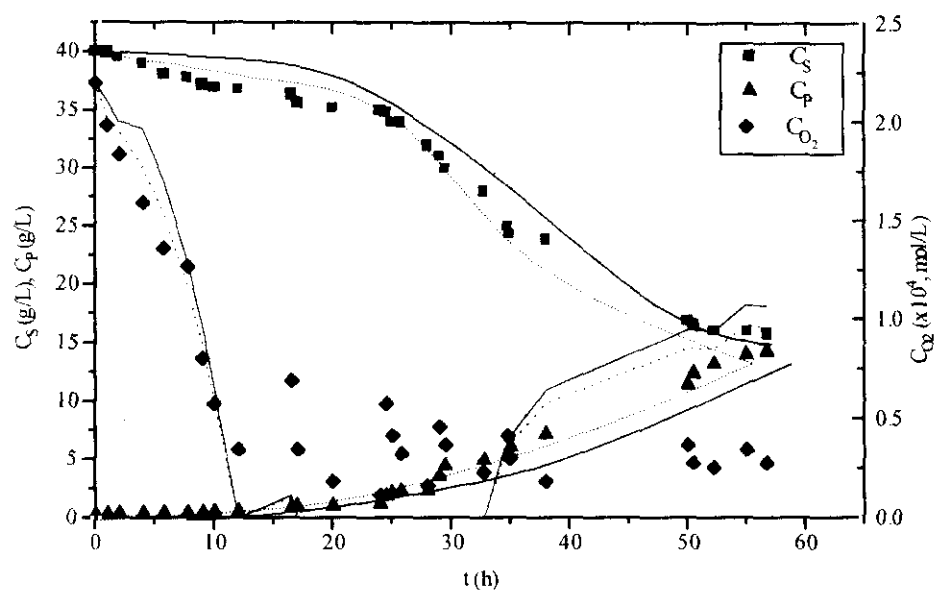


Figura 7.2- Comparación de la reproducción de la evolución de sacarosa, xantano y oxígeno disuelto del experimento n° 1 (25 °C y 257 p.p.m. de amonio inicial) entre el Modelo Cinético Metabólico (línea discontinua) y el Modelo Cinético Químicamente Estructurado (línea continua).

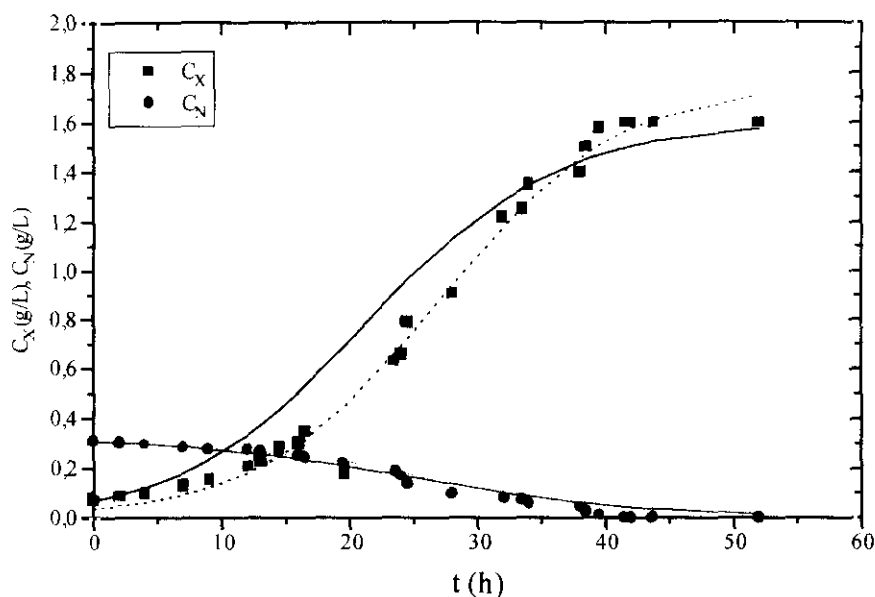


Figura 7.3- Comparación de la reproducción de la evolución de biomasa y amonio del experimento n° 2 (28 °C y 257 p.p.m. de amonio inicial) entre el Modelo Cinético Metabólico (línea discontinua) y el Modelo Cinético Químicamente Estructurado (línea continua).

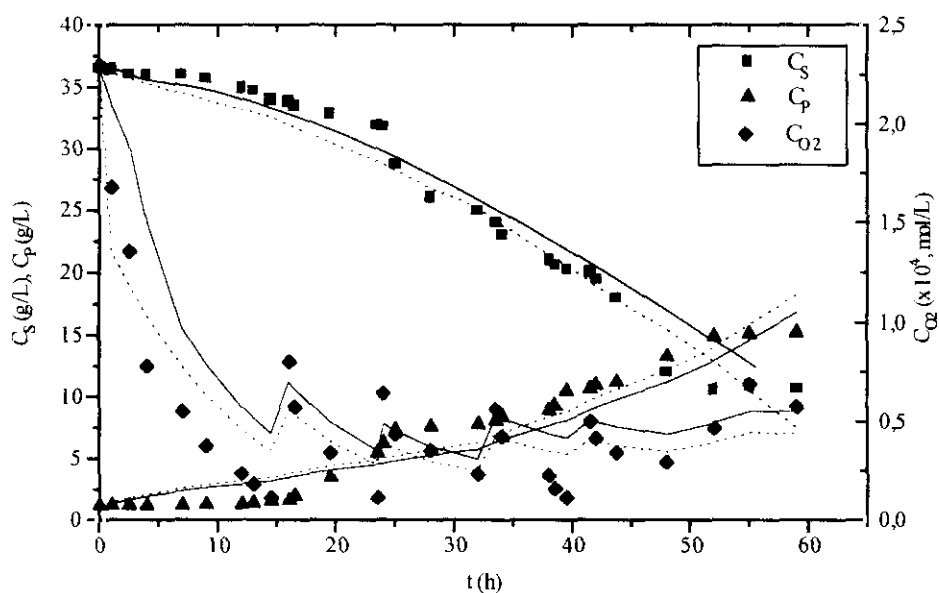


Figura 7.4.- Comparación de la reproducción de la evolución de sacarosa, xantano y oxígeno disuelto del experimento n° 2 (28 °C y 257 p.p.m. de amonio inicial) entre el Modelo Cinético Metabólico (línea discontinua) y el Modelo Cinético Químicamente Estructurado (línea continua).

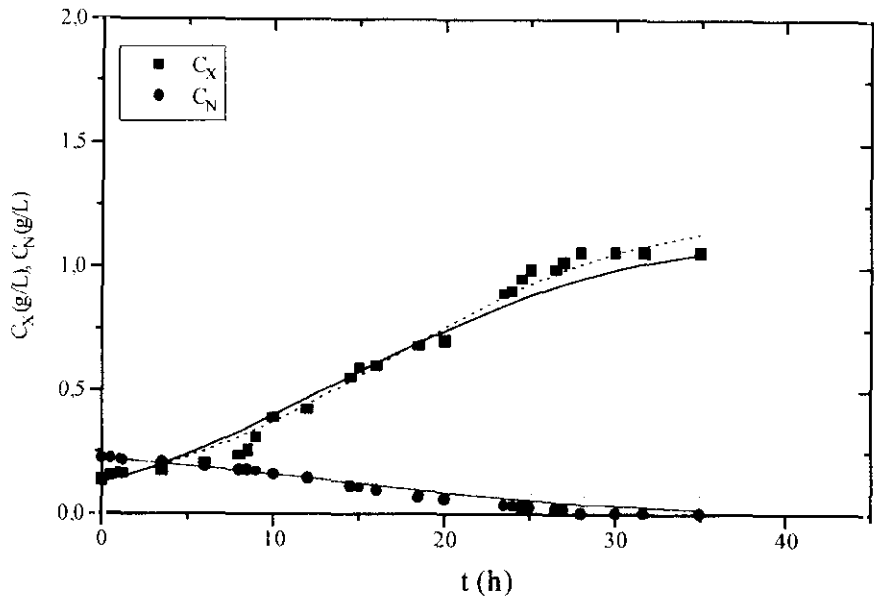


Figura 7.5- Comparación de la reproducción de la evolución de biomasa y amonio del experimento n° 3 (31 °C y 257 p.p.m. de amonio inicial) entre el Modelo Cinético Metabólico (línea discontinua) y el Modelo Cinético Químicamente Estructurado (línea continua).

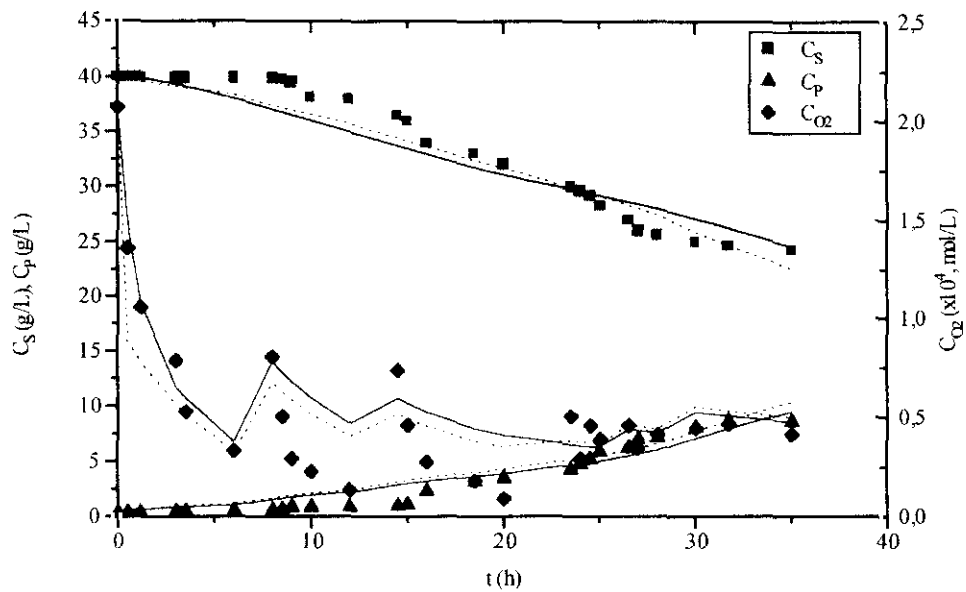


Figura 7.6- Comparación de la reproducción de la evolución de sacarosa, xantano y oxígeno disuelto del experimento n° 3 (31 °C y 257 p.p.m. de amonio inicial) entre el Modelo Cinético Metabólico (línea discontinua) y el Modelo Cinético Químicamente Estructurado (línea continua).

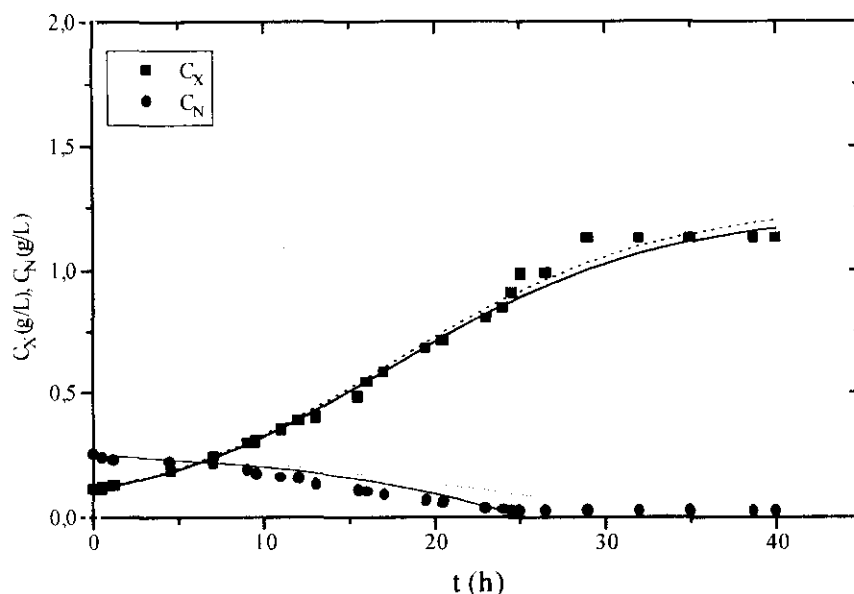


Figura 7.7.- Comparación de la reproducción de la evolución de biomasa y amonio del experimento n° 4 (34 °C y 257 p.p.m. de amonio inicial) entre el Modelo Cinético Metabólico (línea discontinua) y el Modelo Cinético Químicamente Estructurado (línea continua).

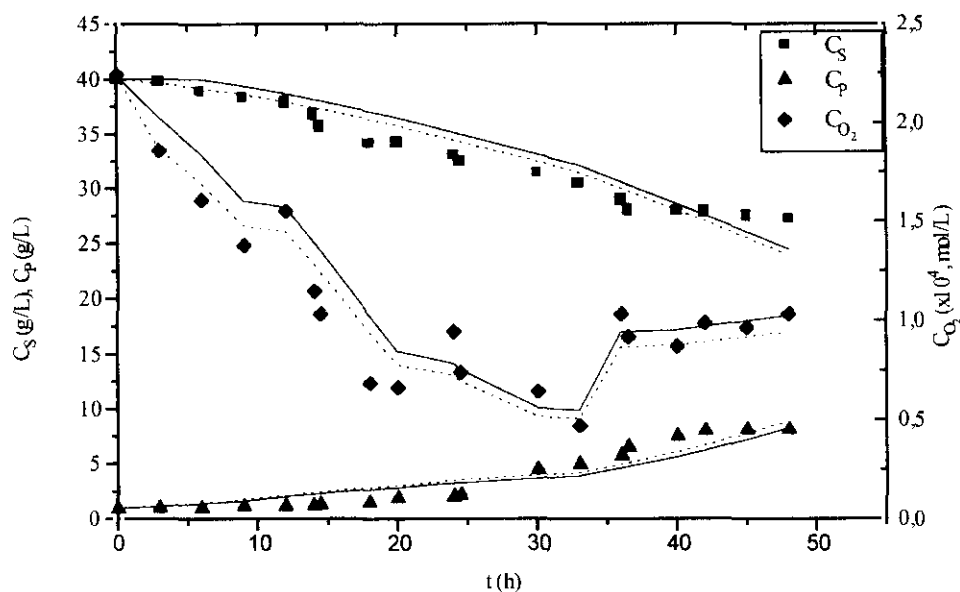


Figura 7.8.- Comparación de la reproducción de la evolución de sacarosa, xantano y oxígeno disuelto del experimento n° 4 (34 °C y 257 p.p.m. de amonio inicial) entre el Modelo Cinético Metabólico (línea discontinua) y el Modelo Cinético Químicamente Estructurado (línea continua).

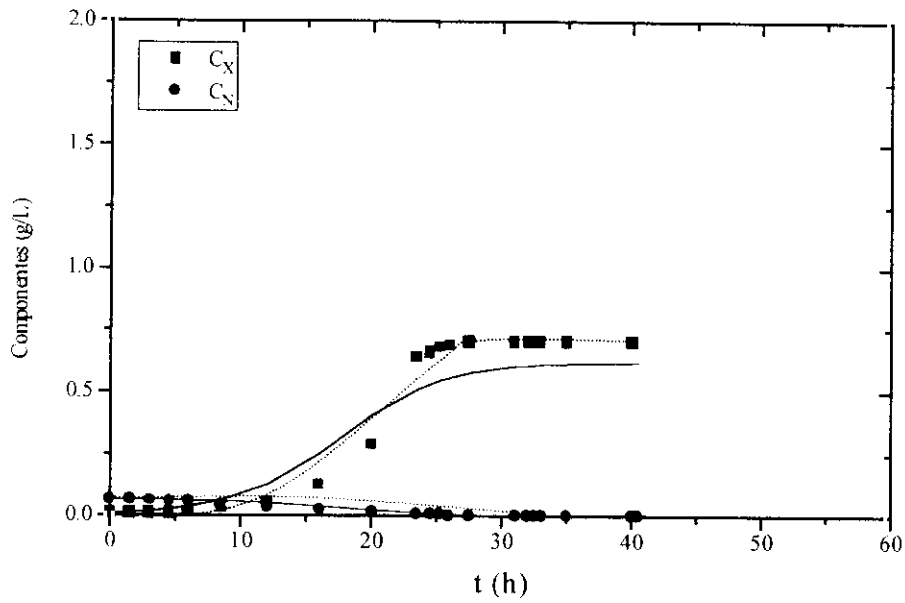


Figura 7.9.- Comparación de la reproducción de la evolución de biomasa y amonio del experimento nº 6 (28 °C y 65 p.p.m. de amonio inicial) entre el Modelo Cinético Metabólico (línea discontinua) y el Modelo Cinético Químicamente Estructurado (línea continua).

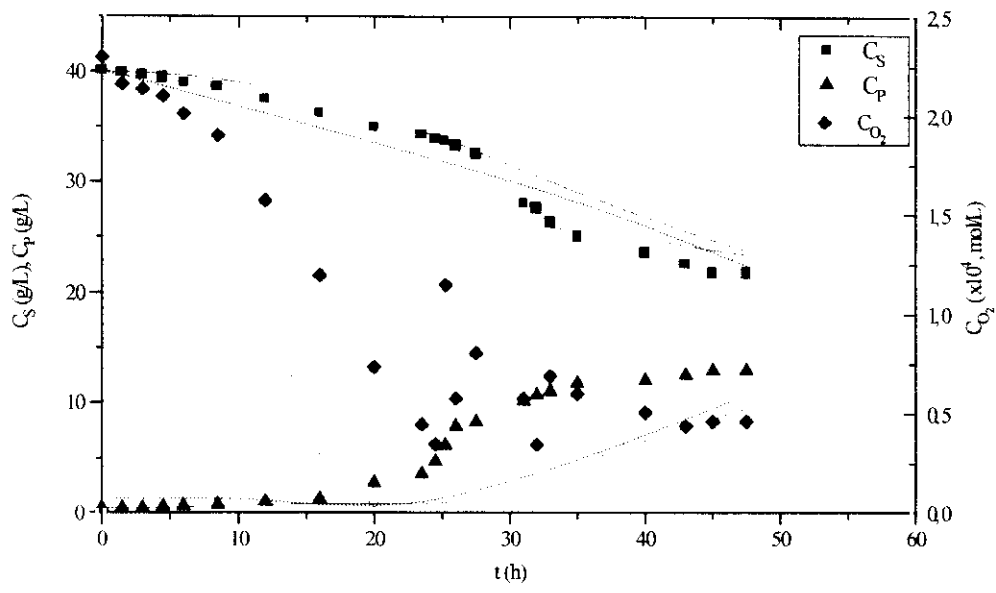


Figura 7.10.- Comparación de la reproducción de la evolución de sacarosa, xantano y oxígeno disuelto del experimento nº 5 (28 °C y 65 p.p.m. de amonio inicial) entre el Modelo Cinético Metabólico (línea discontinua) y el Modelo Cinético Químicamente Estructurado (línea continua).

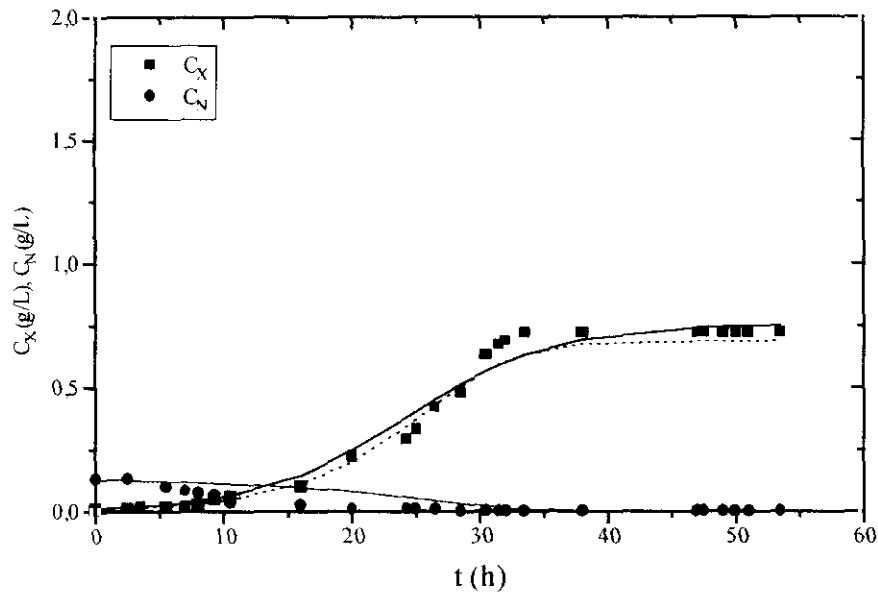


Figura 7.11.- Comparación de la reproducción de la evolución de biomasa y amonio del experimento n° 6 (28 °C y 130 p.p.m. de amonio inicial) entre el Modelo Cinético Metabólico (línea discontinua) y el Modelo Cinético Químicamente Estructurado (línea continua).

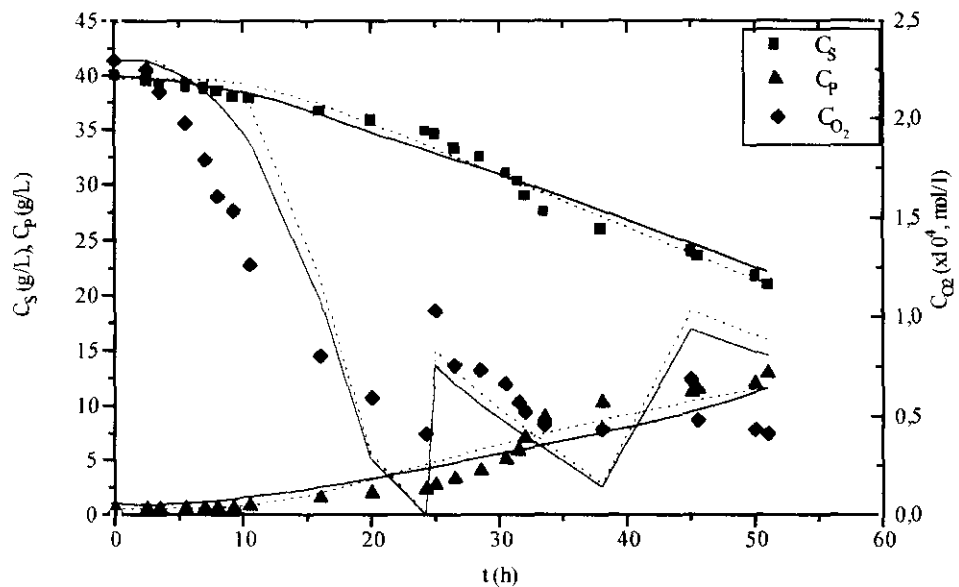


Figura 7.12.- Comparación de la reproducción de la evolución de sacarosa, xantano y oxígeno disuelto del experimento n° 6 (28 °C y 130 p.p.m. de amonio inicial) entre el Modelo Cinético Metabólico (línea discontinua) y el Modelo Cinético Químicamente Estructurado (línea continua).

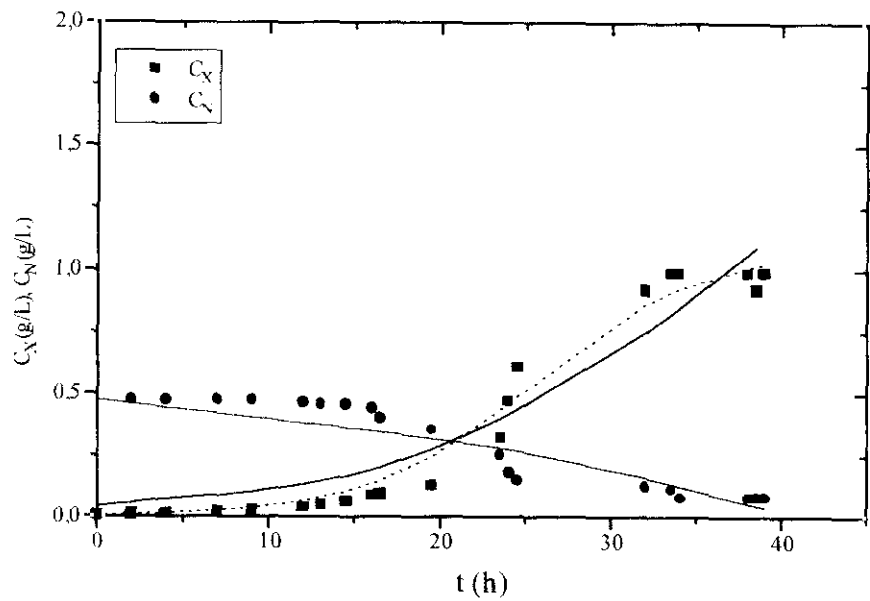


Figura 7.13.- Comparación de la reproducción de la **evolución de biomasa y amonio** del experimento n° 7 (28 °C y 475 p.p.m. de amonio inicial) entre el **Modelo Cinético Metabólico** (línea discontinua) y el **Modelo Cinético Químicamente Estructurado** (línea continua).

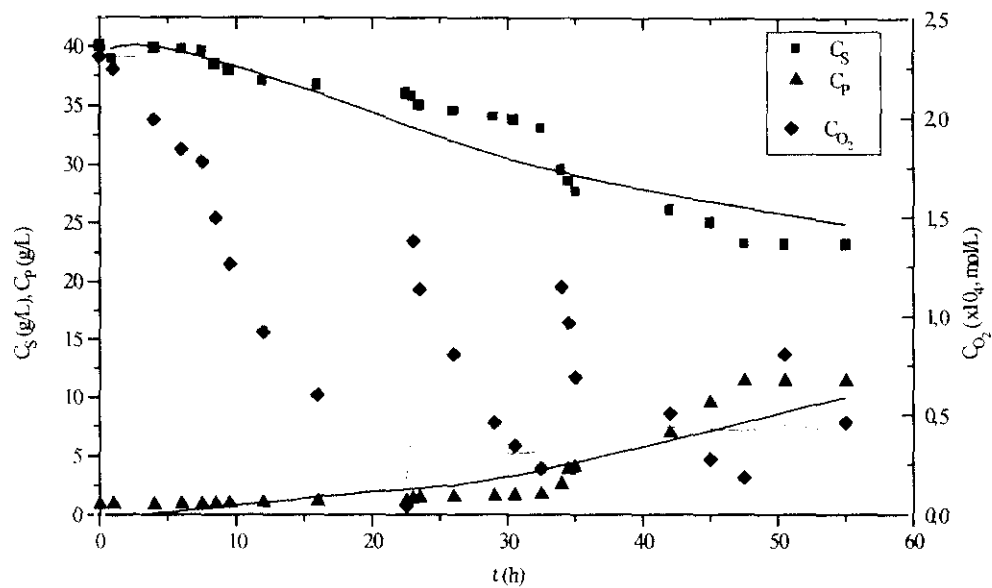


Figura 7.14.- Comparación de la reproducción de la **evolución de sacarosa, xantano y oxígeno disuelto** del experimento n° 7 (28 °C y 475 p.p.m. de amonio inicial) entre el **Modelo Cinético Metabólico** (línea discontinua) y el **Modelo Cinético Químicamente Estructurado** (línea continua).

7.2.1. Mejora del Modelo Químicamente Estructurado

En vista de los resultados obtenidos con el Modelo Cinético Químicamente Estructurado, se puede concluir que los resultados obtenidos son, como cabía esperar muy semejantes a los obtenidos con el Modelo Cinético Metabólico. No obstante, en todos los experimentos con la excepción del experimento realizado a 130 p.p.m, se observa que el MQE predice una concentración de biomasa algo inferior a la experimental, y también inferior a la que predice el modelo metabólico. Esta diferencia en la biomasa se refleja en la evolución de xantano y azúcar, de forma que la concentración de xantano también es inferior en el MQE y por tanto también es menor el consumo de azúcar y de oxígeno disuelto.

La diferencia de la concentración de biomasa con el MQE respecto a la experimental ya fue observada en el capítulo anterior. Esto puede ser debido a que este modelo considera la biomasa como la suma de tres componentes intracelulares, es decir la suma de la concentración de DNA, de RNA y de proteína intracelular en cada momento de la fermentación, y puede ser que haya otro componente que tenga un peso apreciable en dicha biomasa.

Puede ser que el microorganismo, según las condiciones en las que se realice el proceso, acumule otro compuesto intracelularmente, probablemente hidratos de carbono, los cuales no han sido analizados experimentalmente. De esta forma, según las condiciones a las que se haya realizado la fermentación, la diferencia entre la biomasa teórica (suma de DNA, RNA y proteínas intracelulares) y la experimental puede ser mayor o menor.

Por ello, se ha pensado en realizar ajustes con el Modelo Químicamente Estructurado de los datos experimentales, incluyendo un nuevo término en la ecuación correspondiente a la evolución de biomasa, que corresponderá al componente intracelular que se acumula (hidratos de carbono), en la ecuación correspondiente a biomasa. Así la velocidad de producción de biomasa viene dada ahora de la siguiente forma:

$$\frac{dC_X}{dt} = \frac{dC_{RNA}}{dt} + \frac{dC_{DNA}}{dt} + \frac{dC_{PRI}}{dt} + k_{HC} \cdot C_X \quad [7.36]$$

Ya se ha comentado la gran dificultad, desde un punto de vista matemático, de realizar ajustes en múltiple respuesta con un modelo con un número tan elevado de parámetros. Por ello, los ajustes han sido realizados fijando el valor de los parámetros ya calculados de la forma explicada, y dejando flotar únicamente este parámetro correspondiente a hidratos de carbono (k_{HC}).

En la Tabla 7.4 se muestran los valores obtenidos del parámetro k_{HC} por ajuste en múltiple respuesta con el modelo MQE para cada uno de los experimentos realizados en este trabajo.

Tabla 7.4.- Valor del parámetro k_{HC} obtenido por ajuste del MQE a los datos de los experimentos llevados a cabo en este trabajo.

Experimento	Parámetro			t Student		F Fischer		SRC
	Max.	Opt.	Min	Obt.	Teor	Obt.	Teor.	
1	$4,2 \cdot 10^{-4}$	$4,1 \cdot 10^{-4}$	$4,0 \cdot 10^{-4}$	$5,1 \cdot 10^3$	2,9	4221	4,74	0,052
2	$3,02 \cdot 10^{-4}$	$3,01 \cdot 10^{-4}$	$3,00 \cdot 10^{-4}$	$6,5 \cdot 10^3$	2,92	5332	4,75	0,052
3	$1,51 \cdot 10^{-4}$	$1,50 \cdot 10^{-4}$	$1,49 \cdot 10^{-4}$	$4,2 \cdot 10^3$	2,73	8775	3,25	0,008
4	$1,53 \cdot 10^{-4}$	$1,52 \cdot 10^{-4}$	$1,51 \cdot 10^{-4}$	$6,1 \cdot 10^3$	3,25	6775	3,24	0,032
5	$2,7 \cdot 10^{-4}$	$2,71 \cdot 10^{-4}$	$2,71 \cdot 10^{-4}$	$5,1 \cdot 10^3$	2,70	2215	2,90	0,10
6	$2,8 \cdot 10^{-4}$	$2,8 \cdot 10^{-4}$	$2,8 \cdot 10^{-4}$	$7,2 \cdot 10^3$	2,92	2891	4,75	0,024
7	$3,21 \cdot 10^{-4}$	$3,2 \cdot 10^{-4}$	$3,19 \cdot 10^{-4}$	$2,2 \cdot 10^3$	2,9	5223	4,74	0,095

En las Figuras 7.15 a 7.28 se muestran los resultados obtenidos de la reproducción de los datos experimentales con el Modelo Químicamente Estructurado teniendo en cuenta el **término de hidratos de carbono en la evolución de biomasa**. Al igual que en el caso anterior, se muestran los resultados obtenidos con este modelo, indicados con línea continua, y su comparación con el modelo cinético metabólico, indicado por línea discontinua. Como puede observarse en las citadas figuras se obtiene una significativa mejora en la reproducción de los datos experimentales, especialmente en aquellos experimentos donde la diferencia entre la biomasa teórica y la experimental era más significativa.

Por tanto, se concluye que al incluir el término de hidratos de carbono como otro componente más de la biomasa se mejora significativamente la reproducción de los datos experimentales con el Modelo Químicamente Estructurado.

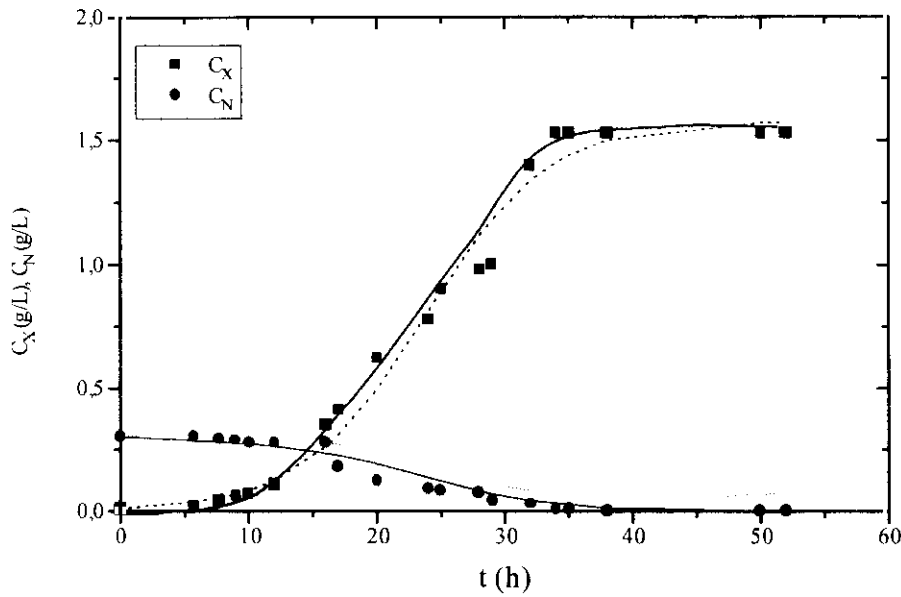


Figura 7.15- Comparación de la reproducción de la evolución de biomasa y amonio del experimento n° 1 (25 °C y 257 p.p.m. de amonio inicial) entre el Modelo Cinético Metabólico (línea discontinua) y el Modelo Cinético Químicamente Estructurado con el término de hidratos de carbono (línea continua).

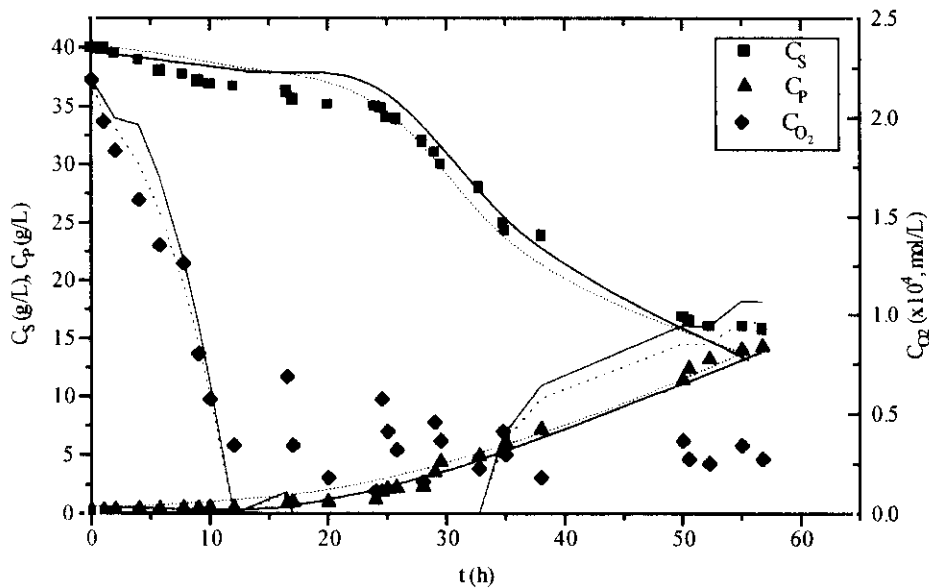


Figura 7.16- Comparación de la reproducción de la evolución de sacarosa, xantano y oxígeno disuelto del experimento n° 1 (25 °C y 257 p.p.m. de amonio inicial) entre el Modelo Cinético Metabólico (línea discontinua) y el Modelo Cinético Químicamente Estructurado con el término de hidratos de carbono (línea continua).

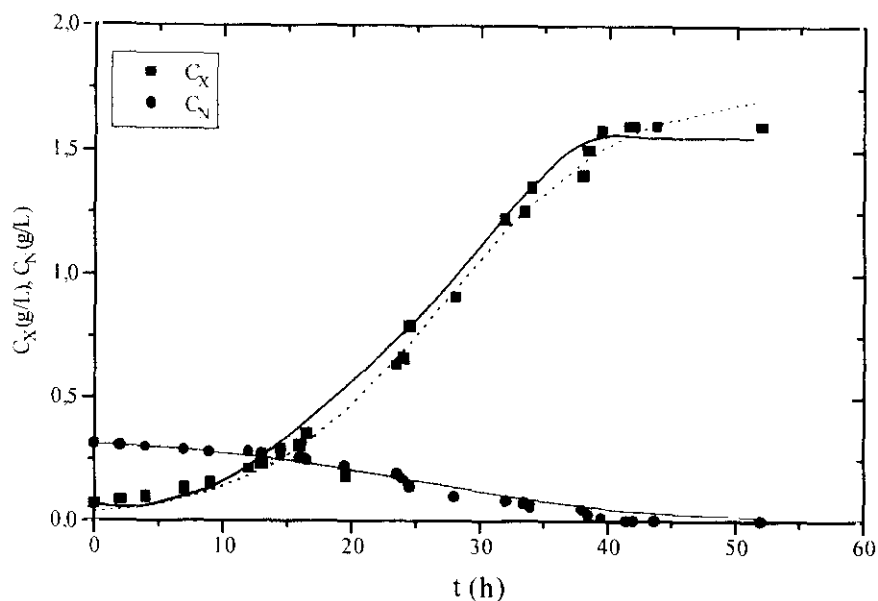


Figura 7.17.- Comparación de la reproducción de la evolución de biomasa y amonio del experimento n° 2 (28 °C y 257 p.p.m. de amonio inicial) entre el Modelo Cinético Metabólico (línea discontinua) y el Modelo Cinético Químicamente Estructurado con el término de hidratos de carbono (línea continua).

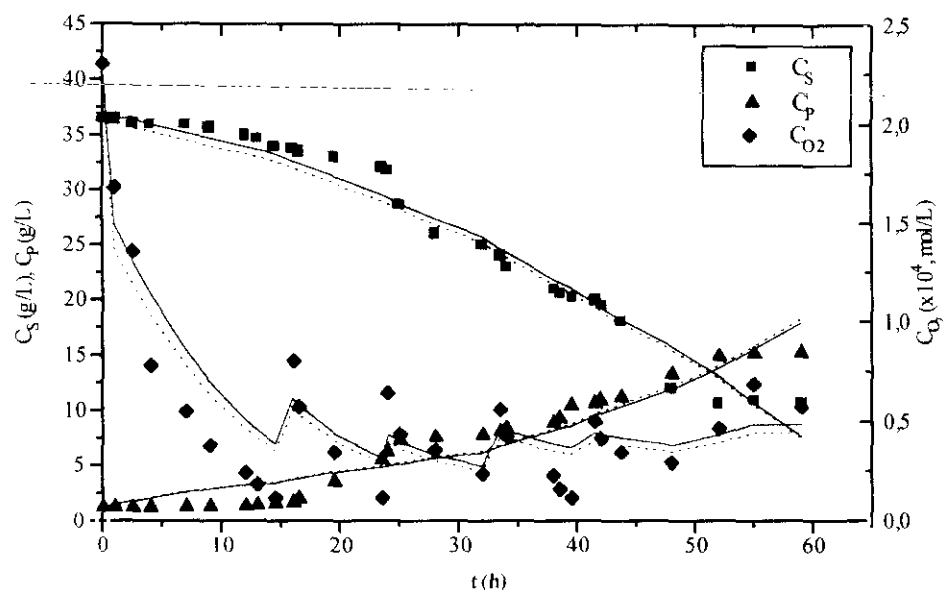


Figura 7.18.- Comparación de la reproducción de la evolución de sacarosa, xantano y oxígeno disuelto del experimento n° 2 (28 °C y 257 p.p.m. de amonio inicial) entre el Modelo Cinético Metabólico (línea discontinua) y el Modelo Cinético Químicamente Estructurado con el término de hidratos de carbono (línea continua).

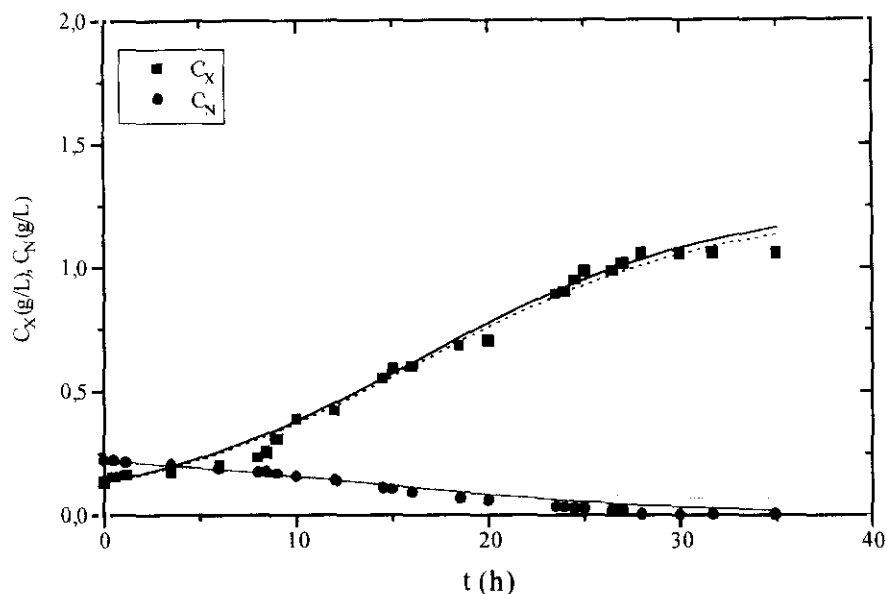


Figura 7.19- Comparación de la reproducción de la evolución de biomasa y amonio del experimento n° 3 (31 °C y 257 p.p.m. de amonio inicial) entre el Modelo Cinético Metabólico (línea discontinua) y el Modelo Cinético Químicamente Estructurado con el término de hidratos de carbono (línea continua).

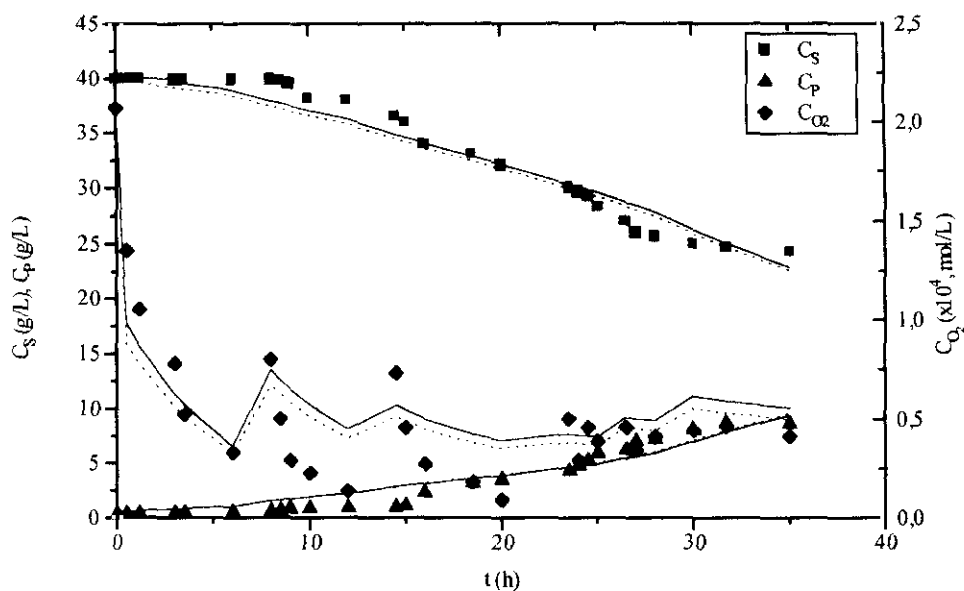


Figura 7.20.- Comparación de la reproducción de la evolución de sacarosa, xantano y oxígeno disuelto del experimento n° 3 (31 °C y 257 p.p.m. de amonio inicial) entre el Modelo Cinético Metabólico (línea discontinua) y el Modelo Cinético Químicamente Estructurado con el término de hidratos de carbono (línea continua).

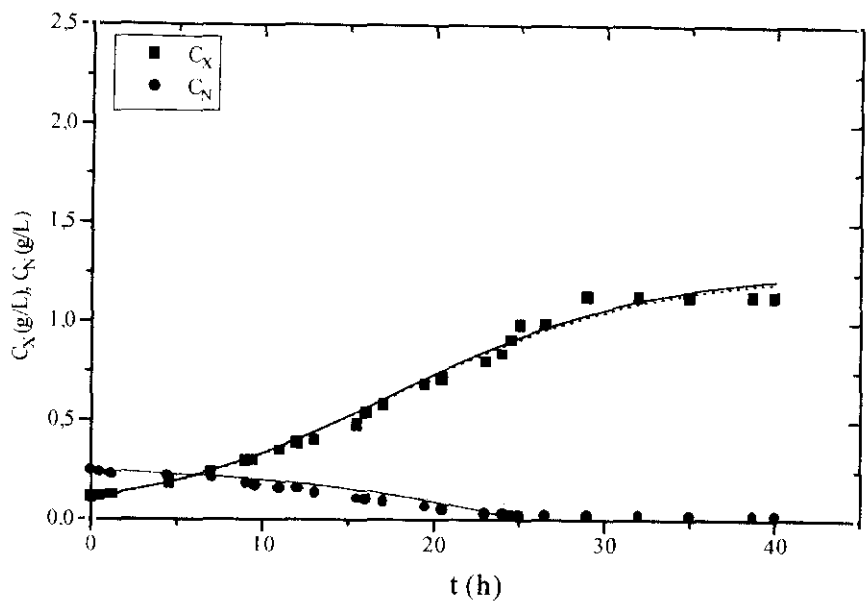


Figura 7.21- Comparación de la reproducción de la evolución de biomasa y amonio del experimento n° 4 (34 °C y 257 p.p.m. de amonio inicial) entre el Modelo Cinético Metabólico (línea discontinua) y el Modelo Cinético Químicamente Estructurado con el término de hidratos de carbono (línea continua).

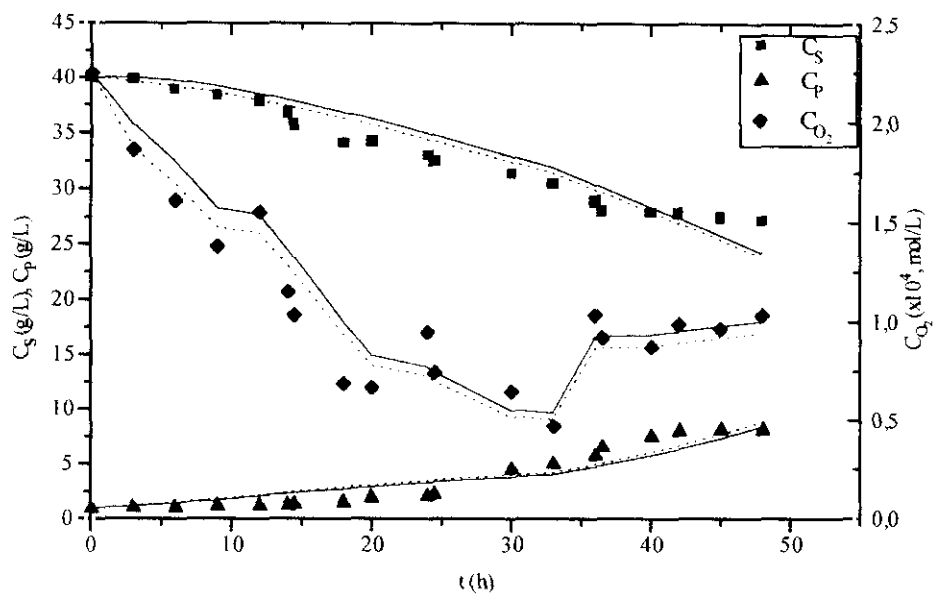


Figura 7.22.- Comparación de la reproducción de la evolución de sacarosa, xantano y oxígeno disuelto del experimento n° 4 (34 °C y 257 p.p.m. de amonio inicial) entre el Modelo Cinético Metabólico (línea discontinua) y el Modelo Cinético Químicamente Estructurado con el término de hidratos de carbono (línea continua).

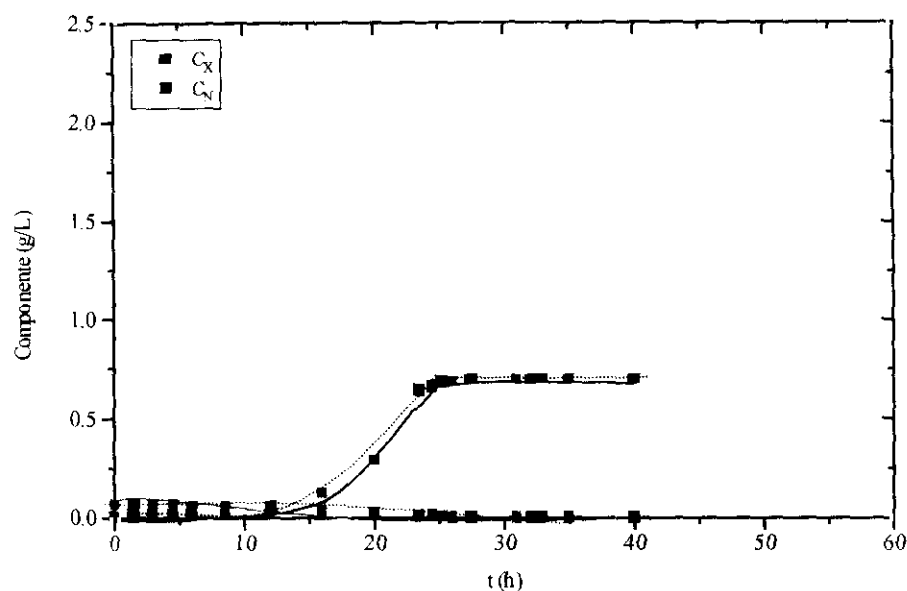


Figura 7.23- Comparación de la reproducción de la evolución de biomasa y amonio del experimento n° 5 (28 °C y 65 p.p.m. de amonio inicial) entre el Modelo Cinético Metabólico (línea discontinua) y el Modelo Cinético Químicamente Estructurado con el término de hidratos de carbono (línea continua).

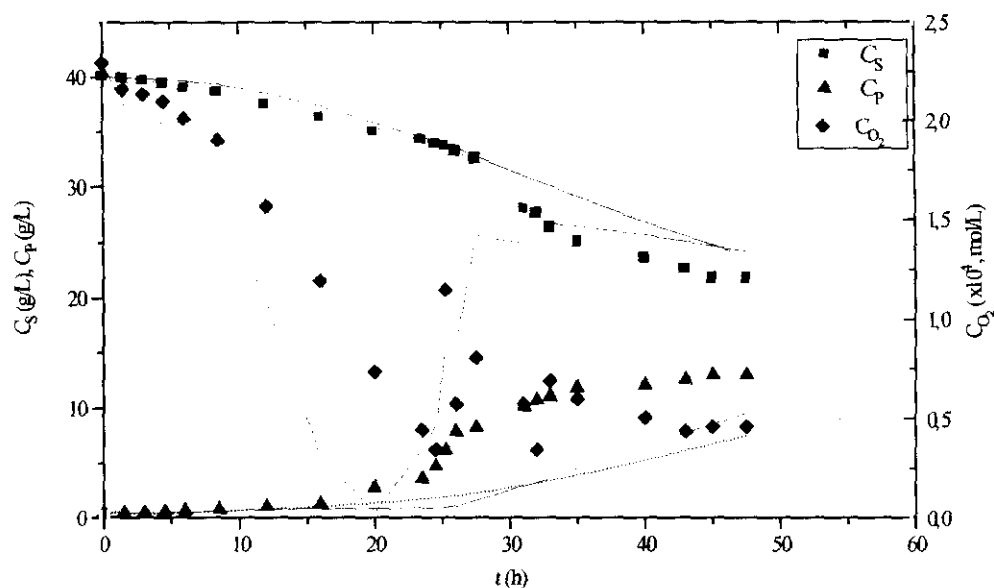


Figura 7.24- Comparación de la reproducción de la evolución de sacarosa, xantano y oxígeno disuelto del experimento n° 5 (28 °C y 65 p.p.m. de amonio inicial) entre el Modelo Cinético Metabólico (línea discontinua) y el Modelo Cinético Químicamente Estructurado con el término de hidratos de carbono (línea continua).

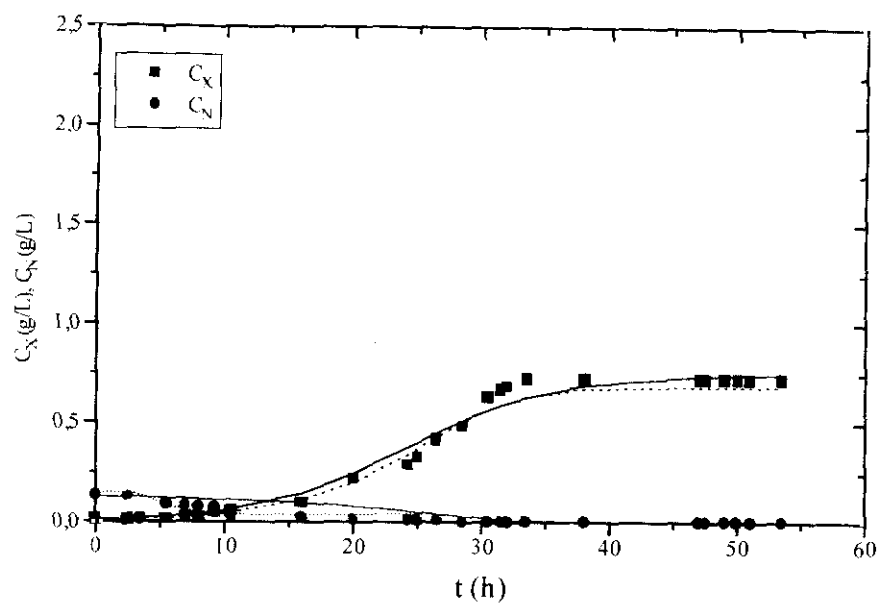


Figura 7.25.- Comparación de la reproducción de la evolución de biomasa y amonio del experimento nº 6 (28 °C y 130 p.p.m. de amonio inicial) entre el Modelo Cinético Metabólico (línea discontinua) y el Modelo Cinético Químicamente Estructurado con el término de hidratos de carbono (línea continua).

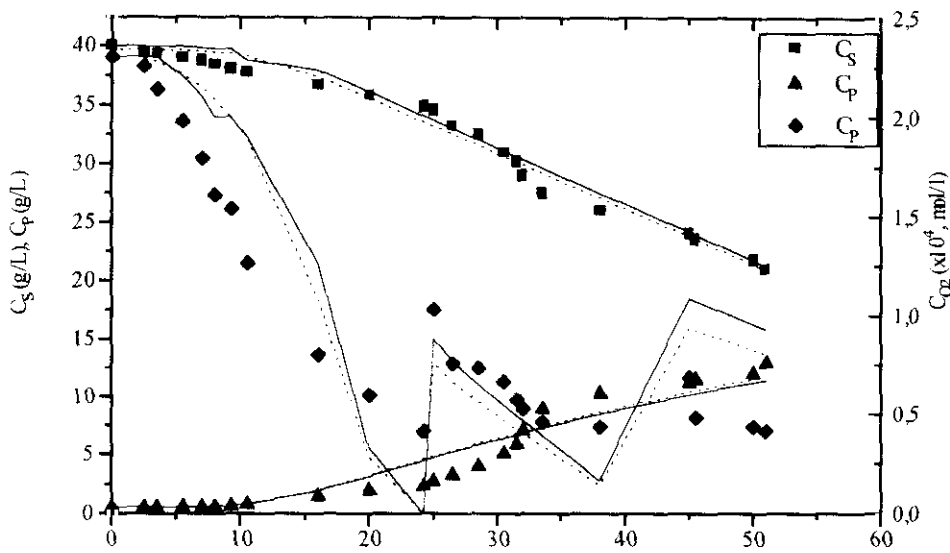


Figura 7.26.- Comparación de la reproducción de la evolución de sacarosa, xantano y oxígeno disuelto del experimento nº 6 (28 °C y 130 p.p.m. de amonio inicial) entre el Modelo Cinético Metabólico (línea discontinua) y el Modelo Cinético Químicamente Estructurado con el término de hidratos de carbono (línea continua).

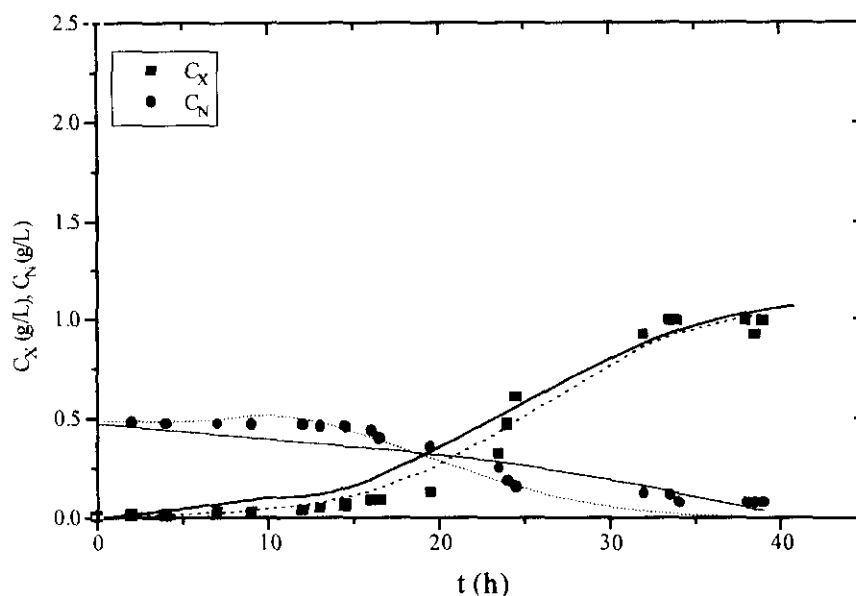


Figura 7.27- Comparación de la reproducción de la evolución de biomasa y amonio del experimento n° 7 (28 °C y 475 p.p.m. de amonio inicial) entre el Modelo Cinético Metabólico (línea discontinua) y el Modelo Cinético Químicamente Estructurado con el término de hidratos de carbono (línea continua).

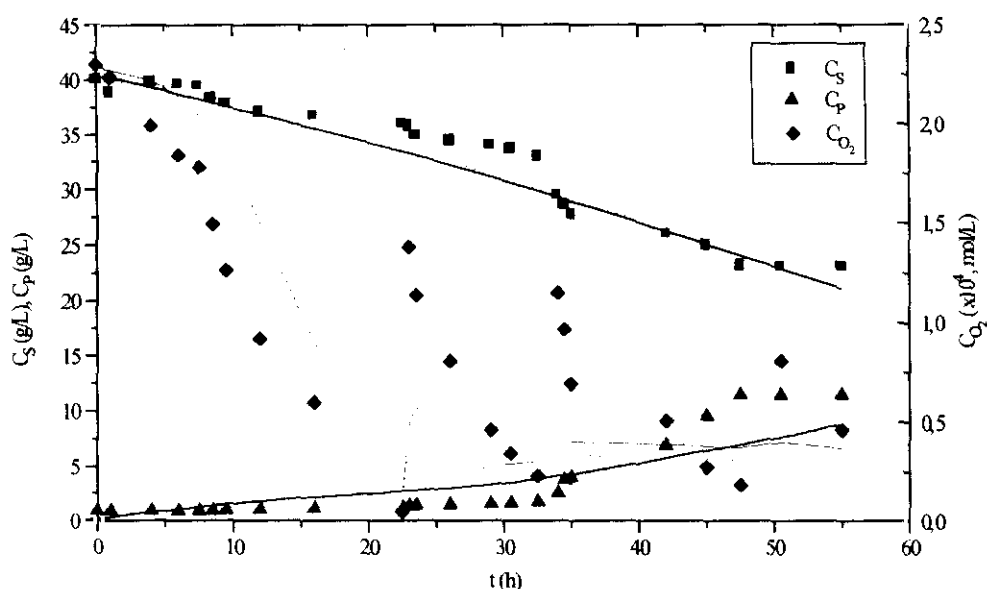


Figura 7.28- Comparación de la reproducción de la evolución de sacarosa, xantano y oxígeno disuelto del experimento n° 7 (28 °C y 475 p.p.m. de amonio inicial) entre el Modelo Cinético Metabólico (línea discontinua) y el Modelo Cinético Químicamente Estructurado con el término de hidratos de carbono (línea continua).

En vista de la importante mejora en los resultados al incluir el componente de hidratos de carbono en el modelo, es necesario ahora observar si el parámetro correspondiente a este componente tiene tendencia con las variables, para llegar de esta manera a un Modelo Químicamente Estructurado definitivo.

En la Figura 7.29, se muestra la tendencia del parámetro k_{HC} con la temperatura (línea continua); la línea discontinua indica la forma de la curva (función) a la que podría ser ajustada la evolución de este parámetro, esto es una función lineal descendente.

En la Figura 7.30 aparece representada la evolución del parámetro k_{HC} con respecto a la concentración inicial de amonio. Como se puede apreciar, se puede asumir, que la tendencia es a un valor más o menos constante, como indica la línea discontinua.

Por tanto, el Modelo Químicamente Estructurado viene dado por las ecuaciones [7.15] a [7.17] para DNA, RNA, proteínas intracelulares, respectivamente. Para la parte correspondiente a la producción, las ecuaciones [7.2] a [7.4] expresan la evolución de sacarosa, xantano y oxígeno disuelto. Finalmente la biomasa vendrá dada por la ecuación [7.35], donde, a su vez, el parámetro k_{HC} viene, en función de la temperatura, por la siguiente ecuación:

$$k_{HC}(T) = 0,00108 - 0,00003 \cdot T \quad [7.36]$$

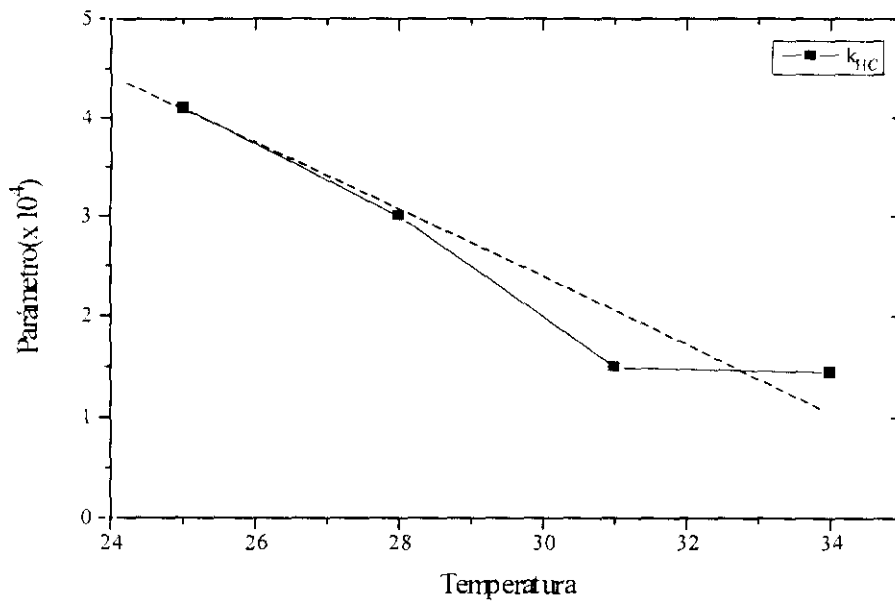


Figura 7.29.- Variación del parámetro k_{HC} del Modelo Cinético Químicamente Estructurado con la Temperatura.

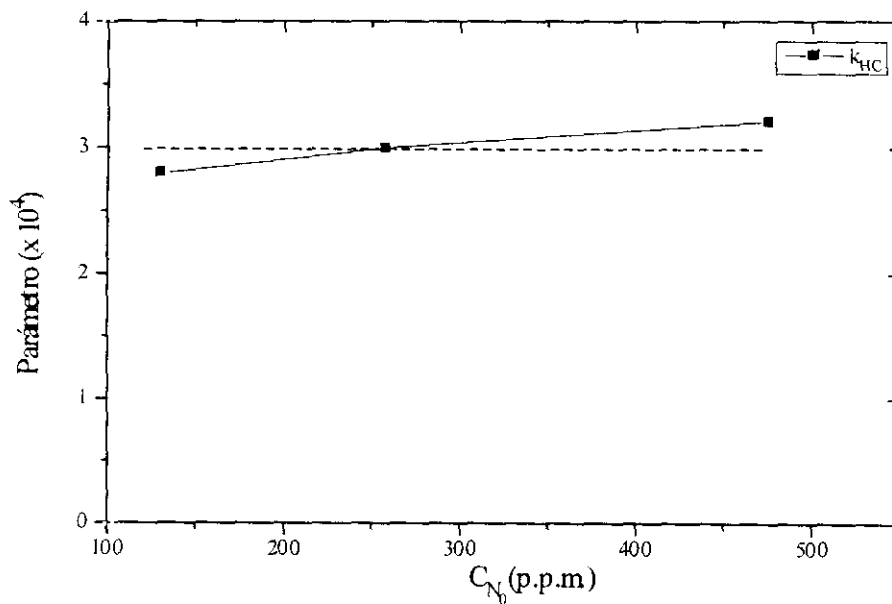


Figura 7.30.- Variación del parámetro k_{HC} del Modelo Cinético Químicamente Estructurado con la concentración inicial de amonio.

7.3.- SIMULACIÓN CON EL MODELO CINÉTICO QUÍMICAMENTE ESTRUCTURADO

Una vez planteado el modelo MQE definitivo, con los valores de los parámetros en función de la temperatura, se puede emplear para realizar simulación de distintas operaciones. Como ya se ha comentado a lo largo de esta Memoria, las simulaciones permiten estudiar la influencia de ciertos factores sobre el sistema considerado sin necesidad de realizar la experimentación oportuna para ello.

La forma más adecuada de realizar simulaciones es teniendo en cuenta la influencia de las variables en los parámetros del modelo cinético planteado. Esto ha sido posible para los experimentos realizados a diferentes temperaturas. Para los experimentos llevados a cabo con diferentes concentraciones iniciales de nitrógeno, no fue necesario tal planteamiento, pues presentaban una tendencia constante con la concentración de nitrógeno inicial, debido a que las expresiones de las ecuaciones cinéticas ya incluyen el término de la concentración de nitrógeno en dichas ecuaciones.

Esto último no había sido conseguido hasta ahora, es decir, ni con el modelo cinético no estructurado ni con el modelo cinético metabólico se pudo obtener relación de parámetros con la variable concentración inicial de amonio. La razón de ello es que el sustrato nitrogenado era abordado, en ambos casos, de forma no estructurada, por lo que estos modelos no eran capaces de predecir la influencia de cambios en la composición del medio, como, por ejemplo, de la concentración inicial de amonio sobre la producción del polisacárido.

El modelo químicamente estructurado es capaz de predecir lo mismo que se había visto para el modelo cinético metabólico (ver capítulo 5 de esta Memoria), pero introduce la posibilidad de predecir la influencia de cambios en la composición del medio, en la producción de xantano, aspecto sin precedente alguno. Por ello, únicamente se presenta en este capítulo la principal mejora en la predicción que introduce el Modelo Químicamente Estructurado planteado.

Se han realizado, por tanto, simulaciones variando la composición del medio, concretamente en lo que respecta a la concentración de nitrógeno inicial. Han sido probadas 4 concentraciones iniciales: 70 p.p.m., 200 p.p.m., 250 p.p.m y 350 p.p.m., no se han realizado simulaciones con concentraciones más elevadas debido al posible efecto inhibitorio de amonio a partir de cierta concentración crítica, que se ha estimado en el mayor de los valores anteriores.

En la Figura 7.31 se muestra la evolución de la biomasa y de amonio con las diferentes concentraciones iniciales de amonio. Se observa que cuanto mayor es la concentración de amonio mayor es la concentración de biomasa alcanzada, y que, por tanto la concentración de sustrato nitrogenado influye notablemente en la velocidad de formación de biomasa.

Aunque solo se muestra la evolución de biomasa, no hay que olvidar que ésta es, en realidad, la suma de componentes intracelulares: DNA, RNA, proteínas intracelulares e hidratos de carbono, cuyas evoluciones con el tiempo de fermentación pueden ser predichas con este modelo.

La Figura 7.32 muestra la influencia de la concentración inicial de amonio en la producción del polisacárido y en el consumo de azúcar. Se observa que existe un máximo en la producción, de forma que la concentración en la que la velocidad de formación de xantano es mayor es con la concentración de 200 p.p.m, con concentraciones superiores o inferiores a ésta la velocidad de producción del polisacárido es menor. Es decir, el modelo químicamente estructurado permite predecir un máximo en la producción del polisacárido dependiendo de la concentración inicial de amonio, aspecto observado experimentalmente.

En la Figura 7.33 se muestra la evolución de oxígeno disuelto para estas mismas condiciones. Como ya se ha visto, la concentración de oxígeno disuelto en cada momento está fundamentalmente relacionada con la concentración del polisacárido, esto es, cuanto mayor sea la concentración de xantano, mayor será la viscosidad y, como consecuencia, menor la velocidad de transporte y concentración de oxígeno disuelto.

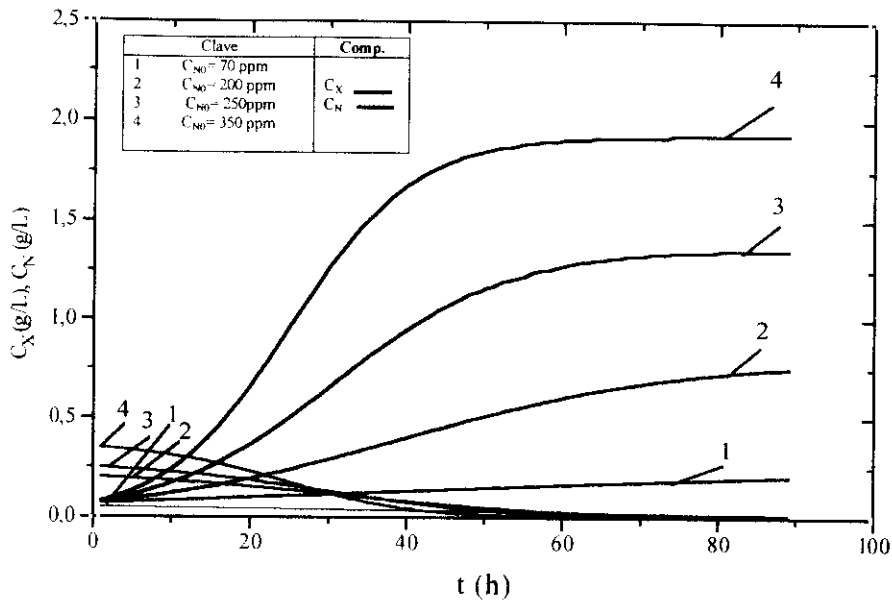


Figura 7.31.- Simulación con el modelo MQE para observar la Influencia de la concentración inicial de amonio sobre la evolución de biomasa y consumo de amonio.

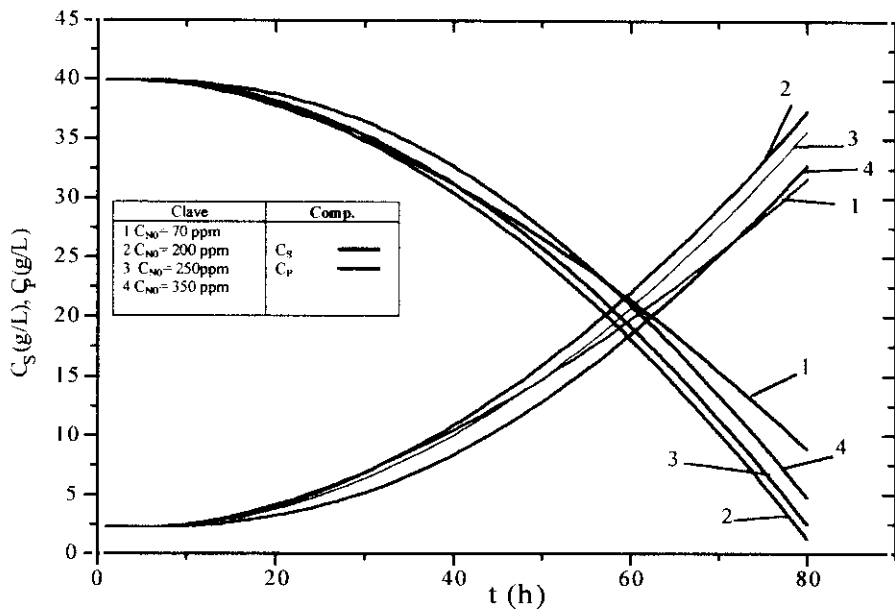


Figura 7.32.- Simulación con el modelo MQE para observar la influencia de la concentración inicial de amonio sobre la evolución de azúcar y producción de xantano.

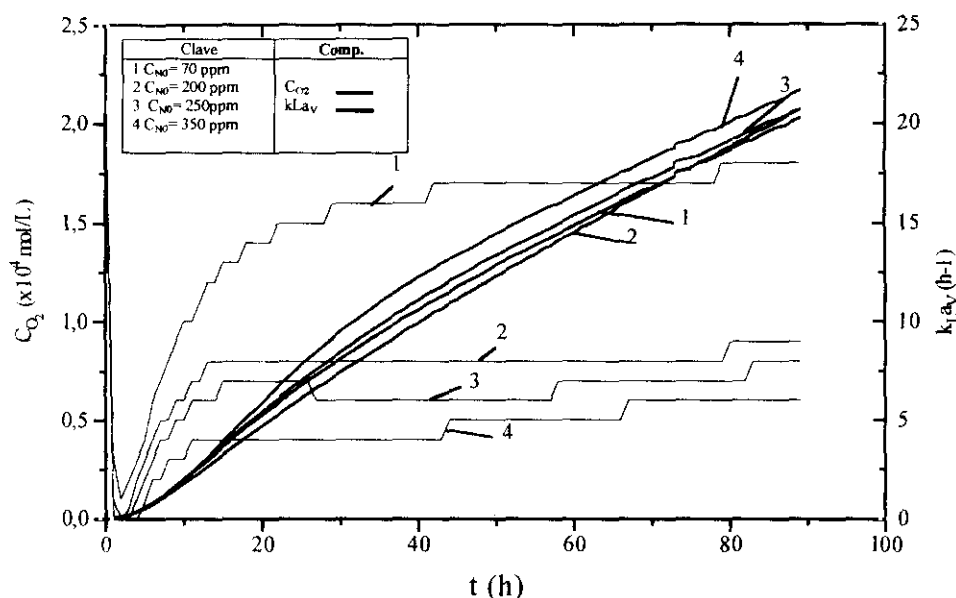


Figura 7.33.- Simulación con el modelo MQE para observar la influencia de la concentración inicial de amonio sobre la evolución de oxígeno disuelto y $k_L a_V$.

Por tanto, se puede concluir que el modelo químicamente estructurado permite una adecuada predicción del proceso de producción de xantano. De la misma manera que ya fue vista para el modelo cinético metabólico, el MQE permite una adecuada reproducción de la evolución del consumo de azúcar, producción de xantano y de la evolución del oxígeno disuelto. Se obtiene una significativa mejora en la predicción de la evolución del sustrato nitrogenado, gracias a la estructuración de este compuesto en el crecimiento del microorganismo.

Parece necesario, por tanto, estructurar el metabolismo, tanto del sustrato carbonado (en el modelo cinético metabólico) y como del sustrato nitrogenado (modelo cinético de célula), tanto en la parte correspondiente al crecimiento como en la producción del producto de interés industrial, con el fin de predecir la influencia de ciertos cambios que, de otra forma, no sería posible llevar a cabo.

La principal mejora que incluye el modelo cinético químicamente estructurado es que al describir de forma más adecuada el crecimiento también lo hará para la producción. Así, por ejemplo, la variación de la concentración inicial de amonio se verá reflejada tanto en el crecimiento como en la producción del polisacárido. La influencia de esta variable en la producción aparece en la Figura 7.34. En ella se puede observar el máximo en la producción que predice el MQE, con la variación de la concentración de amonio en el medio.

La citada Figura representa la comparación entre la concentración de xantano alcanzada a las 50 horas de fermentación que predice el MQE empleando parámetros particulares (línea 1), es decir los obtenidos para cada experimento, y su comparación con la predicción del mismo modelo pero con parámetros generales, es decir el modelo en función de temperatura (línea 2). En la Figura, también aparece (indicada por puntos) la concentración de xantano experimental obtenida con las diferentes concentraciones de nitrógeno a las 50 horas de fermentación.

Para los tres casos se observa un máximo en la producción entre la concentración de amonio de 200 y 250 p.p.m.. La principal diferencia entre ellas estriba en que la reproducción del polisacárido con los parámetros particulares proporciona concentraciones de xantano inferiores a los valores experimentales, mientras que con la reproducción con los datos particulares se consiguen concentraciones de xantano mayores que la experimental, si bien hay que comentar que no son diferencias muy significativas, de apenas 1-1,5 g/L de diferencia.

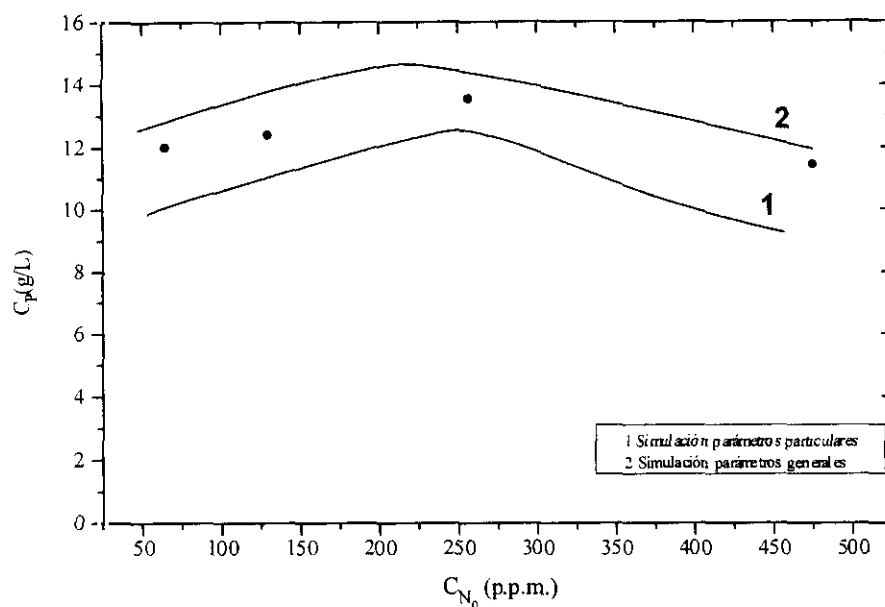


Figura 7.34.- Predicción con el MQE de la concentración de xantano alcanzada a las 50 horas de fermentación con diferentes concentraciones iniciales de amonio.

Por tanto, el **Modelo Químicamente Estructurado** consigue la descripción adecuada de los componentes del sistema objeto de estudio y permite predecir la influencia en el proceso de variables como la temperatura y la concentración inicial de la fuente nitrogenada, algo que sin duda puede abrir el camino de facilitar la laboriosa tarea del cambio de escala en los procesos llevados a cabo por microorganismos, e incluso el diseño de los medios de producción.

8.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

8.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

8.1- RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se ha llevado a cabo el desarrollo de modelos cinéticos de diferente grado de complejidad para observar su capacidad de describir la influencia de ciertas variables en un sistema microbiano, con el fin de obtener un modelo predictivo tanto de la evolución del sistema en sí, como de su respuesta a perturbaciones en las condiciones de operación del proceso. Para ello, se ha aplicado la metodología empleada por la Ingeniería Química en el campo del desarrollo y aplicación de los modelos cinéticos de redes complejas de reacciones.

El sistema microbiano elegido en este trabajo, para realizar el desarrollo y aplicación de los modelos cinéticos, ha sido la **Producción de Xantano**. La elección de este sistema de producción se debe a que es un proceso bien conocido, desde el punto de vista metabólico y microbiológico, y ha sido ampliamente estudiado por el equipo de investigación en el que se ha realizado el presente trabajo. El xantano es un biopolisacárido que se obtiene mediante fermentación sumergida de sustratos carbonados en presencia de la bacteria aerobia *Xanthomonas campestris* y otra serie de nutrientes esenciales para el crecimiento del microorganismo. El citado polisacárido es ampliamente utilizado en diferentes tipos de industrias (farmacéutica, alimentaria, textil, etc.) debido a la propiedad que presentan sus

disoluciones, una elevada viscosidad en un amplio intervalo de condiciones, incluso con una baja concentración de polisacárido.

El fenómeno de transferencia de oxígeno cobra especial importancia en este sistema ya que la bacteria es aerobia estricta, es decir precisa del mismo para subsistir y para llevar a cabo la producción. La viscosidad generada en el caldo durante la fermentación, por la propia producción del polisacárido, dificulta enormemente la transferencia de oxígeno al microorganismo (Gómez, 1995).

En trabajos previos se optimaron las condiciones de operación necesarias para llevar a cabo la producción del polisacárido (preparación del inóculo, temperatura, perfil de agitación, etc.), así como la composición del medio a emplear en el proceso (Santos, 1993). Asimismo, se ha observado la influencia de las citadas condiciones de operación en las propiedades del producto obtenido (reología de sus disoluciones, peso molecular y contenidos en acetato y piruvato) (Casas y Col., 1999).

En este trabajo se han propuesto, como se ha comentado anteriormente, modelos cinéticos de diferente grado de complejidad. El primer modelo propuesto es un **modelo no estructurado-no segregado (MNE)**, es decir, la población microbiana se ha considerado como un componente o reactante más del sistema, que se denomina "biomasa" sin tener en cuenta las reacciones que se producen en su interior tanto para el crecimiento del microorganismo como para la síntesis del producto de interés. En este modelo se tienen en cuenta observaciones experimentales tales como que el sustrato nitrogenado es el limitante del crecimiento y que el xantano es un producto parcialmente asociado al proceso de crecimiento.

El siguiente paso en la complicación del modelo es el planteamiento de un **Modelo Cinético Metabólico**, es decir, la población microbiana se sigue considerando de la misma forma que en el caso del modelo no estructurado y no se tienen en cuenta las reacciones que se dan en el interior del microorganismo para la reproducción del mismo; sin embargo, las reacciones que tienen lugar para la obtención del producto se han considerado, mediante un esquema de reacciones con estequiometría definida. Se ha propuesto un esquema de reacción simplificado, empleando herramientas de Ingeniería Química, como el *lumping* o agrupamiento de compuestos similares en un único compuesto tipo y la suposición de estado

pseudoestacionario para componentes como el ATP y los cofactores. Se proponen relaciones estequiométricas simplificadas considerando que el sustrato carbonado se emplea para la síntesis de xantano y para el mantenimiento del microorganismo en estado viable, principalmente.

Las reacciones que tienen lugar dentro de los microorganismos para que se produzca el crecimiento o reproducción de los mismos, se han considerado aisladamente, proponiendo un **Modelo Cinético de Célula**; es decir, se ha desarrollado un modelo en el que no se tiene en cuenta la parte correspondiente a la producción de xantano, sino únicamente la parte correspondiente al crecimiento, considerando la biomasa microbiana constituida por componentes intracelulares como son proteínas y ácidos nucleicos (RNA y DNA), proponiendo un esquema de reacción simplificado. Se considera además que parte de las proteínas que produce el microorganismo van a ser secretadas al medio, esto es son proteínas extracelulares.

El último de los modelos que se ha desarrollado es del tipo denominado **Químicamente Estructurado**, ya que considera tanto las reacciones intracelulares que dan lugar al crecimiento como aquellas que tienen como resultado la producción del compuesto de interés. Por lo tanto, este modelo está formado por la unión del modelo de célula para la descripción del crecimiento y del modelo metabólico para la descripción de la producción.

La aplicación de los citados modelos se ha llevado a cabo mediante ajuste estadístico de datos, obtenidos experimentalmente en diferentes condiciones, al modelo cinético planteado en cada caso, por lo que ha sido necesario tanto el desarrollo de programas de cálculo oportunos, como la obtención de los datos experimentales.

Los programas de cálculo aplicados han sido realizados en FORTRAN 77, empleándose siempre el algoritmo de regresión no lineal de Marquardt (1963) tanto en simple como en múltiple respuesta, acoplado a algoritmos de integración (Runge-Kutta y Simpson), ya que en todos los casos se ha utilizado el método integral para llevar a cabo el cálculo de los parámetros cinéticos de los diferentes modelos propuestos.

El trabajo experimental se ha realizado en un bio-reactor comercial de 1,5 L de volumen útil tipo tanque agitado y aireado. Las condiciones de operación empleadas han

sido las optimadas previamente, como ya se ha comentado: un caudal de aire de 1 L/L/min ; un pH inicial de 7, no siendo controlado durante la fermentación; perfil de agitación con una velocidad de 210 r.p.m., variable a lo largo del tiempo (Santos 1993, García-Ochoa y col., 1997). Como fuente de carbono se ha empleado sacarosa en concentración de 40 g/L y el medio de producción usado ha sido el propuesto por García-Ochoa y col. (1992) como óptimo para la producción de xantano. Las variables estudiadas en el trabajo experimental han sido la **temperatura** (25, 28, 31 y 34 °C) y la **concentración del nutriente nitrogenado** (amonio: 65, 130, 257 y 475 p.p.m.) en el medio de producción, ya que en estudios previos se ha observado que ambas variables influyen en la evolución del sistema, incluso con la presencia de un máximo en la producción de xantano.

El **Modelo Cinético No Estructurado** propuesto está formado por un sistema de ecuaciones diferenciales con cuatro componentes clave o respuestas (biomasa, sustrato carbonado, producto y oxígeno disuelto) y siete parámetros (ecuaciones [4.13] a [4.18]).

Se llevó a cabo el ajuste de los datos experimento a experimento con este modelo, obteniéndose valores de los parámetros para cada uno de dichos experimentos. Los citados valores son capaces de describir de forma satisfactoria la evolución de la biomasa, el sustrato carbonado y el producto en todos los casos, pero la descripción de la evolución de oxígeno disuelto y la predicción del consumo del sustrato nitrogenado obtenidos no son aceptables. La simplicidad de este modelo hace que presente varias deficiencias, ya que con él no es posible tener en cuenta las influencias en la producción de xantano ni del oxígeno disuelto, ni de la cantidad de sustrato nitrogenado suministrado al sistema y, además, los parámetros obtenidos mediante este modelo no son relacionables con la temperatura. Por tanto, este modelo sencillo parece útil únicamente para la descripción de experimentos aislados.

El **Modelo Cinético Metabólico** desarrollado pretende subsanar las deficiencias observadas en el Modelo No Estructurado. Para ello, ha sido necesario el planteamiento de un esquema de reacción simplificado del metabolismo del sustrato carbonado considerando las rutas metabólicas por las que transcurre el proceso. Es decir, en este modelo se realiza la estructuración del metabolismo del sustrato carbonado en una serie de reacciones, el sustrato nitrogenado no se estructura y, al igual que en el modelo anterior, no es considerado como respuesta en el esquema de reacción. El modelo consta de relaciones estequiométricas

definidas que consideran la producción de xantano (ecuación [5.1]), el catabolismo total de la glucosa (ecuación [5.5]), la fosforilación oxidativa (ecuación [5.6]) y la energía necesaria para el mantenimiento del microorganismo en estado viable (ecuación [5.7]). Para compuestos como ATP y Cofactores se realiza la suposición de estado pseudoestacionario, ya que no han sido medidos.

El modelo metabólico es capaz de describir la evolución de todos los componentes ajustados (biomasa, sustrato carbonado, xantano y oxígeno disuelto) de forma satisfactoria; sin embargo, la predicción de la evolución del sustrato nitrogenado no es buena, debido a que se emplean las mismas ecuaciones para la descripción del crecimiento que en el modelo anterior, como ya se ha comentado. En cuanto a la influencia de las variables en los parámetros, con este modelo ha sido posible proponer expresiones en función de la temperatura de los parámetros presentes en la parte que se había desarrollado. Asimismo, este modelo es capaz de predecir la influencia en la producción y en el consumo del sustrato carbonado de cambios en la transferencia de oxígeno (variaciones en la agitación o en el caudal de aire suministrado) en el sistema, ya que en las citadas relaciones estequiométricas aparece el oxígeno como un reactante más y éste está incluido en las ecuaciones cinéticas propuestas, ya que se considera como nutriente limitante del proceso. La influencia de la concentración inicial de sustrato nitrogenado en la producción no se puede tener en cuenta con este modelo ya que describe el crecimiento de forma muy simplificada.

Para el planteamiento del **Modelo Cinético de Célula** fue necesario el desarrollo de metodología debido a que en la literatura no se encontraron antecedentes de modelos de este tipo para el sistema de producción de xantano; y aunque existen para otros sistemas, los parámetros no se calculan por ajuste de datos experimentales.

En primer lugar, para la aplicación de modelos cinéticos de célula, es necesario el **análisis de componentes intracelulares**, para lo que fue preciso el desarrollo de métodos de análisis de los citados componentes. Este fue un punto esencial en la realización del presente trabajo, debido a la dificultad de realizar el análisis de estos compuestos por las técnicas bioquímicas convencionales, al menos para bacterias. El método adoptado en este trabajo para tal análisis fue la **Citometría de Flujo**. Esta técnica de fluorescencia está siendo empleada cada vez más en Microbiología debido a la gran cantidad de información que permite obtener sobre un cultivo microbiano (parámetros estructurales y funcionales),

con una elevada precisión y rapidez. En este sentido, es necesario realizar un especial esfuerzo para la conversión de los datos obtenidos por esta técnica (datos cualitativos o semicuantitativos) en datos cuantitativos (necesarios para la aplicación de los modelos cinéticos), obteniendo curvas patrón, empleando otra técnica de fluorescencia para el calibrado: Espectrofluorimetría. En el presente trabajo se ha desarrollado un procedimiento para el análisis cuantitativo de proteínas intracelulares, RNA y DNA, mediante tinción con fluoróforos específicos (Isotiocianato de Fluoresceína e Ioduro de Propidio) y su posterior análisis en el citómetro de flujo.

Una vez obtenidos datos experimentales de la evolución de los componentes intracelulares, es necesaria la aplicación de un método para la propuesta de modelos cinéticos de este tipo. Primero debe hacerse una propuesta de un **esquema de reacción simplificado** del metabolismo microbiano (Figura 6.1). En este esquema se propone que el sustrato nitrogenado va a ser empleado por el microorganismo para la formación de aminoácidos no formadores de bases, es decir los que formarán proteínas, dentro de éstas hay que distinguir aquellas que constituyen la propia biomasa (proteína intracelular) y aquellas que serán secretadas al exterior (proteína extracelular). Además, el sustrato nitrogenado será empleado para la formación de aminoácidos formadores de bases, es decir, aquellos que evolucionarán hacia RNA y DNA.

A partir del esquema anterior se han realizado diferentes simplificaciones empleando la hipótesis de estado pseudoestacionario para diferentes compuestos, como aminoácidos formadores de bases o para RNA mensajero, obteniéndose dos esquemas de reacción simplificados (MCC-1 y MCC-2).

Una vez planteados los posibles esquemas de reacción, es necesario conocer qué tipo de ecuaciones cinéticas son las más apropiadas en cada caso. El método empleado para determinar qué expresiones cinéticas pueden ser utilizadas ha sido el método de las **velocidades de reacción** (García-Ochoa y Romero, 1993), en el que se pueden aislar las citadas expresiones cinéticas siempre que el número de componentes clave del sistema coincida con el número de relaciones independientes, es decir, que la matriz de los coeficientes estequiométricos sea cuadrada. En todos los casos, se probaron ecuaciones tanto tipo potencial de primer y segundo orden como tipo hiperbólico o Monod. Los resultados de aplicar el método de velocidades de reacción sobre las dos simplificaciones

propuestas llevaron a plantear una cinética de primer orden para la velocidad de reacción de aminoácidos formadores de bases, y cinéticas de segundo orden e hiperbólicas para el resto de las velocidades de reacción.

La combinación de los dos esquemas de reacción junto con las diferentes posibilidades de las ecuaciones cinéticas lleva a plantear hasta ocho modelos cinéticos distintos, así que se hace necesario emplear **criterios de discriminación** entre ellos. Se han utilizado criterios estadísticos y físicos (García-Ochoa y col., 1989a y 1990a). Los primeros criterios aplicados fueron los estadísticos con el fin de observar la bondad del ajuste. Los valores de la *t* de Student de cada uno de los parámetros obtenidos, así como la *F* de Fischer y el valor de la suma de residuos al cuadrado (SRC) obtenido del ajuste de los experimentos con cada modelo, permitió discriminar cuatro de los ocho modelos propuestos. A continuación se aplicaron criterios físicos, como el estudio de la evolución del valor de los parámetros obtenidos con las variables estudiadas. Aunque todos presentaban tendencias claras, hay dos modelos que parecen dar un mejor resultado, concretamente uno de ellos cuyos parámetros pueden ser puestos en función de la temperatura de acuerdo a las expresiones dadas por las ecuaciones [6.42] a [6.45].

El modelo propuesto es capaz de reproducir los datos de componentes intracelulares obtenidos experimentalmente, en las diferentes condiciones, de forma plenamente satisfactoria. No obstante, hay dos experimentos en los que los resultados deben ser mejorable, para el experimento realizado con 65 p.p.m. de amonio inicial y el realizado con 475 p.p.m. de este compuesto. En ambos casos, los resultados obtenidos no son tan buenos como en el resto de experimentos. Por ello, se introdujeron cambios en cada caso con el fin de superar las deficiencias presentadas. En el caso del experimento con mayor cantidad de amonio (475 p.p.m.) se observa un efecto de inhibición por este sustrato, por lo que se incluyó un término capaz de predecirlo en el modelo planteado para tener en cuenta tal efecto, y con ello mejorar la reproducción de los datos experimentales (ecuación [6.50]). Para el experimento realizado con la concentración más baja de amonio (65 p.p.m.), fue necesario cambiar la estequiometría en la producción de proteínas, pues al realizar el balance de nitrógeno se había observado que “faltaba” nitrógeno, lo que hizo suponer que el microorganismo estaría produciendo componentes con otra composición en nitrógeno (ecuación [6.47]).

Este modelo cinético de célula presenta una evolución coherente de los parámetros con las variables estudiadas. Con la concentración de nitrógeno, la tendencia de todos los parámetros es a un valor constante, con la temperatura pueden ser ajustados a diferentes funciones, por tanto se puede obtener un modelo de célula en función de la temperatura.

Una vez obtenido el modelo de célula, se desarrolló el **Modelo Químicamente Estructurado**, en el se que unen los últimos dos modelos comentados: modelo metabólico y modelo de célula. En este modelo, tanto el sustrato carbonado como el nitrogenado se estructuran en las diferentes etapas del metabolismo del microorganismo objeto de estudio. Al hacer la comparación de las reproducciones de los datos experimentales obtenidas a partir de el modelo químicamente estructurado con el modelo metabólico, se observa que el primero predice menos concentración de biomasa y de xantano. Para mejorar estos resultados se incluyó un término de hidratos de carbono en la biomasa (ecuación [7.35]), con ello se consigue tanto la mejora en la reproducción de biomasa como de xantano y, en consecuencia, de consumo de sacarosa y de oxígeno disuelto.

El modelo final, Modelo Químicamente Estructurado, es capaz de predecir la influencia de las mismas variables que el modelo cinético metabólico pero con la clara mejora de la influencia de la concentración inicial de sustrato nitrogenado, amonio.

Con ello, es posible tener un modelo cinético que explique la influencia, tanto en crecimiento como en producción, de variables como la temperatura o cambios en la composición del medio, sobre la evolución de los principales componentes del sistema, algo sin precedentes en la literatura.

8.2.- CONCLUSIONES

- 1.- El **Modelo Cinético No Estructurado** es capaz de predecir la evolución del sistema en experimentos aislados. El experimento realizado en las condiciones óptimas ($T= 28^{\circ}\text{C}$; $C_{N0}=0,257 \text{ g/L}$; $N=210 \text{ r.p.m.}$, variable) se puede describir con el siguiente conjunto de ecuaciones:

$$\begin{aligned}\frac{dC_X}{dt} &= 0,535 \cdot \left(\frac{C_{X0}}{6,073} + C_{N0} \right) \cdot C_X \cdot \left[1 - \frac{C_X}{C_{X0} + 6,07 \cdot C_{N0}} \right] \\ \frac{dC_N}{dt} &= -\frac{1}{6,07} \cdot \frac{dC_X}{dt} \\ \frac{dC_S}{dt} &= -0,416 \cdot C_X - \frac{1}{0,139} \cdot \frac{dC_X}{dt} \\ \frac{dC_P}{dt} &= 0,0147 \cdot C_S \cdot C_X \\ \frac{dC_{O_2}}{dt} &= k_L a_V \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) - \left(\frac{1}{10,86} \cdot \frac{dC_X}{dt} \right) - 2,02 \cdot 10^{-3} \cdot C_X\end{aligned}$$

1.1.- El Modelo No Estructurado es capaz de describir adecuadamente la evolución del sustrato carbonado, del producto y de la biomasa en cada experimento. Sin embargo, no es capaz de describir adecuadamente la evolución del oxígeno disuelto, ni la evolución del sustrato nitrogenado durante el proceso.

1.2.- Los parámetros obtenidos con el Modelo No Estructurado para diversos experimentos no son relacionables con la temperatura, ni con ninguna otra variable.

1.3.- El Modelo No Estructurado no es capaz de predecir la influencia en la evolución de los componentes del sistema (sustrato carbonado, xantano, biomasa) de cambios en variables que afectan a la velocidad de transferencia de oxígeno, como la agitación y el caudal de aire suministrados.

2.- El **Modelo Cinético Metabólico** es capaz de predecir razonablemente bien la evolución de los componentes del sistema y está formado por el siguiente conjunto de ecuaciones diferenciales:

$$\begin{aligned} \frac{dC_X}{dt} &= k_X \cdot \left(\frac{C_{X0}}{Y_{XN}} + C_{N0} \right) \cdot C_X \cdot \left(1 - \frac{C_X}{C_{X0} + Y_{XN} \cdot C_{N0}} \right) \\ \frac{dC_S}{dt} &= 180 \cdot \left\{ -\frac{5,94}{923,2} \cdot \frac{dC_P}{dt} - \frac{1}{12} \cdot \frac{k_4 \cdot C_{O_2}}{K_4 + C_{O_2}} \cdot C_X \cdot \left[1 - 3,58 \cdot \left(\frac{1 + 4 \cdot Y_{rp}}{3,58 + 4 \cdot Y_{ATPP}} \right) \right] \right\} \\ &\quad - \frac{1}{Y_{XS}} \cdot \frac{dC_X}{dt} \\ \frac{dC_P}{dt} &= 923,2 \cdot \frac{k_4 \cdot C_{O_2}}{K_4 + C_{O_2}} \cdot \left(\frac{1 + 4 \cdot Y_{rp}}{3,58 + 4 \cdot Y_{ATPP}} \right) \cdot C_X \\ \frac{dC_{O_2}}{dt} &= -\frac{0,3}{923,2} \cdot \frac{dC_P}{dt} - 0,5 \cdot \frac{k_4 \cdot C_{O_2}}{K_4 + C_{O_2}} \cdot C_X + k_L a_V \cdot (C^* - C_{O_2}) - \frac{1}{Y_{OX}} \cdot \frac{dC_X}{dt} \\ r_X &= k_X \cdot \left(\frac{C_{X0}}{Y_{XN}} + C_{N0} \right) \cdot C_X \cdot \left(1 - \frac{C_X}{C_{X0} + Y_{XN} \cdot C_{N0}} \right) \\ r_4 &= \frac{k_4 \cdot C_{O_2}}{K_4 + C_{O_2}} \cdot C_X \cdot \left(\frac{1 + 4 \cdot Y_{rp}}{3,58 + 4 \cdot Y_{ATPP}} \right) \\ r_2 &= \frac{1}{12} \cdot \frac{k_4 \cdot C_{O_2}}{K_4 + C_{O_2}} \cdot C_X \cdot \left(1 - 3,58 \cdot \left(\frac{1 + 4 \cdot Y_{rp}}{3,58 + 4 \cdot Y_{ATPP}} \right) \right) \\ Y_{rp} &= 1,2 \cdot \frac{C_{O_2}}{K_4 + C_{O_2}} \\ Y_{ATPP} &\approx 34 \end{aligned}$$

2.1.- El modelo metabólico predice de forma adecuada la evolución de la biomasa, el sustrato carbonado, el producto y el oxígeno disuelto en todos los experimentos realizados. Sin embargo, no es capaz de predecir la evolución de la concentración del sustrato nitrogenado en los diferentes experimentos.

2.2.- Los parámetros obtenidos del ajuste al modelo metabólico de experimentos realizados a diferentes temperaturas son relacionables, habiéndose obtenido las siguientes expresiones de los mismos en función de la citada variable:

$$k(T) = \{ 0,94 \cdot (T - 19,45) \cdot [1 - \exp(1,399 \cdot (T - 34,24))] \}^2$$

$$k'(T) = -2,913 + 2,048 \cdot T$$

$$Y_{OX}(T) = \{ 0,597 \cdot (T - 24,35) \cdot [1 - \exp(-0,205 \cdot (T - 37,16))] \}^2$$

$$Y_{XS}(T) = 0,340 + (-6,1 \cdot 10^{-3}) \cdot T$$

2.3.- El modelo metabólico es capaz de predecir de forma adecuada la influencia de la temperatura en el consumo de sustrato, producción de xantano y evolución del oxígeno disuelto en el sistema. En la Figura 8.1 se muestra la influencia de esta variable sobre la producción del polisacárido que predice el modelo a las 60 horas de fermentación. Se observa un máximo aproximadamente a 28°C, coincidente con el observado experimentalmente (Santos, 1993; García-Ochoa y col., 1997).

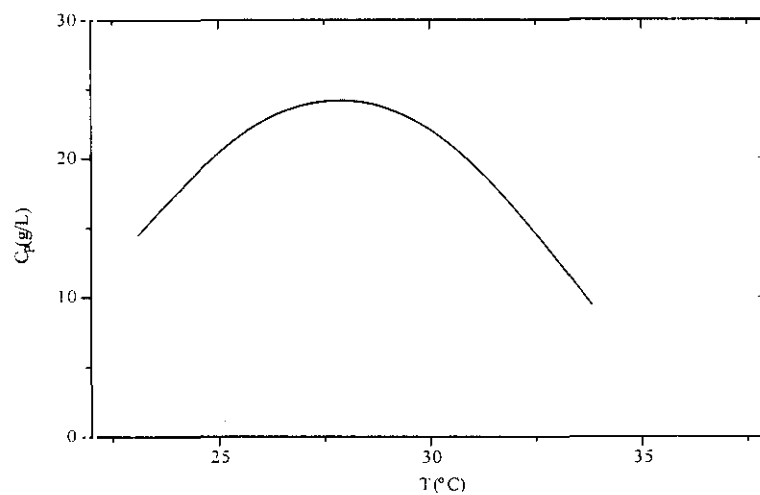


Figura 8.1.- Evolución de la concentración de xantano alcanzada a las 60 horas de fermentación con diferentes temperaturas de operación.

2.4.- El modelo metabólico es capaz de predecir la influencia de cambios en las variables que afectan a la transferencia de oxígeno (agitación y caudal de aire) en la evolución del sustrato carbonado y del producto. A modo de ejemplo se muestra en la Figura 8.2 (a, b y c) la evolución de la concentración de xantano alcanzada a las 60 h de fermentación con diferentes valores de porcentaje de saturación del oxígeno disuelto, de k_{LaV} y con diferentes caudales de oxígeno, respectivamente.

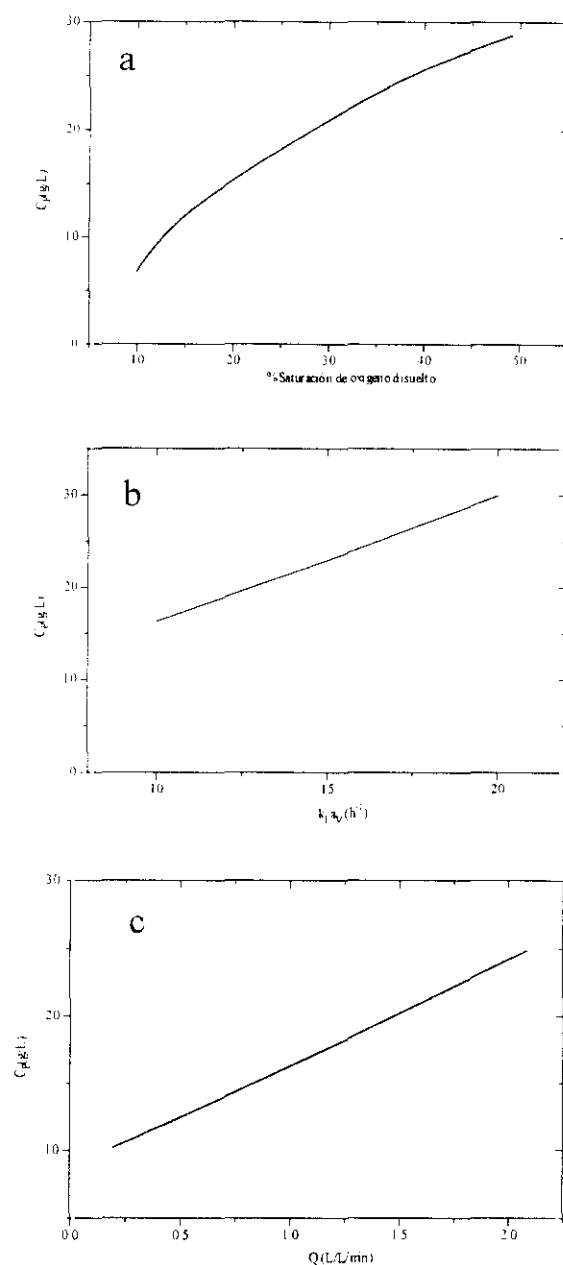


Figura 8.2.- Evolución de la concentración de xantano alcanzada a las 60 horas de fermentación con diferentes condiciones que afectan a la concentración de oxígeno disuelto en el caldo.

- a) Variación del % de oxígeno disuelto
- b) Variación de $k_L a_v$
- c) Variación del caudal

3.- La **citometría de flujo** es una técnica excelente para el seguimiento y análisis de componentes intracelulares, tales como DNA, RNA y proteínas, durante una fermentación.

3.1.- Se puede afirmar que no es adecuado realizar análisis de componentes intracelulares mediante **técnicas bioquímicas convencionales** con bacterias dada la escasa reproducibilidad de los ensayos. Esto se debe a tres aspectos fundamentales:

- a) La etapa de rotura de las células es crítica, pues no es posible saber si se rompen todas las células cuyo componente intracelular se analiza. Los datos vendrán siempre referidos a la cantidad de biomasa que se emplea, por lo que será la primera fuente de error.
- b) La etapa de extracción y purificación del componente también es delicada, debido a las sucesivas centrifugaciones que se deben realizar para el análisis. Durante estas operaciones se puede perder parte del componente intracelular.
- c) La labilidad de algunos componentes provoca que cuando se rompe la célula, y su contenido forma parte del homogeneizado, algunos de los componentes se degradan con suma facilidad, como por ejemplo es el caso del RNA.

3.2.- La espectrofluorimetría permite obtener buenos resultados cuantitativos de la concentración de los componentes intracelulares. La espectrofluorimetría es una técnica de fluorescencia que emplea fluoróforos específicos para cada componente (isotiocianato de fluoresceína para proteínas y yoduro de propidio para ácidos nucleicos). Para diferenciar entre ambos es necesario digerir con RNAasa para analizar DNA y con DNAasa para el análisis de RNA.

- a) El protocolo de preparación de las muestras en esta técnica no incluye la rotura celular y, por tanto, tampoco la extracción de los componentes, con lo que la espectrofluorimetría permite solventar los problemas encontrados con las técnicas bioquímicas convencionales.
- b) La espectrofluorimetría permite la obtención de curvas de calibrado para relacionar la concentración del componente y la intensidad de fluorescencia a una cierta longitud de onda que presenta el componente a analizar. En este trabajo, para *Xanthomonas campestris*, se han determinado las siguientes:

$$C_{PR}^F (g / L) = 1,93 \cdot 10^{-3} \cdot IF^F \cdot FD \quad (\lambda^{exc}=536; \lambda^{emi}=623)$$

$$C_{DNA}^F (g / L) = 3,68 \cdot 10^{-4} \cdot IF^F \cdot FD \quad (\lambda^{exc}=494; \lambda^{emi}=520)$$

$$C_{RNA}^F (g / L) = 3,46 \cdot 10^{-4} \cdot IF^F \cdot FD \quad (\lambda^{exc}=494; \lambda^{emi}=520)$$

3.3.- La citometría de flujo es una técnica muy adecuada para el análisis de componentes intracelulares durante un proceso con microorganismos, ya que:

- a) El protocolo de preparación de las muestras es idéntico al realizado para el análisis por espectrofluorimetría.
- b) Se pueden obtener datos cuantitativos mediante citometría de flujo gracias a las curvas de calibrado para cada componente, obtenidas con el apoyo de la espectrofluorimetría. En este trabajo, para *Xanthomonas campestris*, se han obtenido las siguientes:

$$C_{PR}^C (g / L) = (0,25 \cdot IF - 5,95) \cdot FD \cdot NC \quad (\lambda^{exc}=536; \lambda^{emi}=623)$$

$$C_{DNA\&RNA}^C (g / L) = 0,11 \cdot IF_{CMF} \cdot FD \cdot NC \quad (\lambda^{exc}=494; \lambda^{emi}=520)$$

La gran cantidad de parámetros analizables por citometría de flujo hacen de esta técnica una herramienta muy importante para obtener información cuantitativa, rápida y fiable de la concentración de componentes intracelulares, como son: viabilidad celular, tamaño y complejidad de las células, pH intracelular, actividad metabólica, conteo del número de células, entre otras.

4.- En el Capítulo 6 de la presente Memoria se ha propuesto un método para desarrollar un modelo cinético de célula basado en las siguientes etapas:

- a) Proponer un esquema simplificado de reacción utilizando *lumping* de especies químicas y la observación de la evolución de los componentes del sistema.
- b) Utilizar el método de las velocidades de reacción para probar distintas ecuaciones cinéticas para las reacciones que figuran en el esquema de reacción.
- c) Ajustar los datos experimentales por una regresión en multi-respuesta y aplicar criterios de discriminación entre modelos, de carácter estadístico y físico.

El método de las velocidades de reacción permite la individualización (simple respuesta) de las reacciones correspondientes a cada componente, facilitando mucho el desarrollo de modelos complejos para microorganismos. Permite también obtener parámetros iniciales, para cada una de las ecuaciones cinéticas planteadas, facilitando así el ajuste posterior en múltiple respuesta.

5.- El **Modelo Cinético de Célula** desarrollado es capaz de predecir la evolución de los componentes intracelulares del microorganismo, esto es del DNA, RNA y de las proteínas intracelulares, que constituyen la biomasa. Está formado por el siguiente conjunto de ecuaciones diferenciales:

$$\begin{aligned}
 \frac{dC_X}{dt} &= \frac{dC_{RNA}}{dt} + \frac{dC_{DNA}}{dt} + \frac{dC_{PRI}}{dt} \\
 \frac{dC_{RNA}}{dt} &= r_3 \\
 \frac{dC_{DNA}}{dt} &= r_5 \\
 \frac{dC_{PRI}}{dt} &= r_1 - \frac{dC_{PRE}}{dt} \\
 \frac{dC_{NH_4^+}}{dt} &= 18 \cdot \left(-1,4 \cdot \frac{r_1}{136,5} - \frac{r_2}{103,5} - 2,75 \cdot \frac{r_3}{478,6} - 2,75 \cdot \frac{r_5}{491,7} \right)
 \end{aligned}$$

Siendo:

$$r_1 = k_1 \cdot C_N \cdot C_X$$

$$r_3 = k_3 \cdot C_N \cdot C_X$$

$$r_5 = k_5 \cdot C_N \cdot C_X$$

$$r_{2m} = k_2 \cdot C_N$$

5.1.- El modelo de célula predice de forma adecuada la evolución de la los componentes que constituyen la biomasa, siendo capaz de predecir la evolución de la concentración del sustrato nitrogenado en los diferentes experimentos ajustados de forma satisfactoria.

5.2.- Los parámetros obtenidos del ajuste al modelo de célula de experimentos realizados a diferentes temperaturas son relacionables con dicha variable, habiéndose obtenido las siguientes expresiones:

$$k_1(T) = 1,49 - 0,036 \cdot T$$

$$k_3(T) = 0,150$$

$$k_5(T) = 0,198$$

$$k_2(T) = \{ 0,041 \cdot (T - 21) \cdot [1 - \exp(0,352 \cdot (T - 35,08))] \}^2$$

El modelo de célula es capaz, por tanto, de predecir la influencia de la temperatura en la evolución de los componentes intracelulares.

5.3.- Los parámetros obtenidos del ajuste al modelo de célula de experimentos realizados a diferentes concentraciones de nitrógeno presentan un valor constante con esta variable. Esto era previsible dadas las cinéticas en función de la concentración de amonio que se pueden observar en las ecuaciones del modelo. El amonio presenta un efecto inhibitorio para el crecimiento en concentración inicial de 475 p.p.m., por lo que se debe de introducir un término de inhibición en el modelo propuesto para describir el sistema bajo esta situación, de forma:

$$\frac{dC_{PRI}}{dt} = (r_1 - C_{PRE}) - k_I \cdot (C_N - C_{Ne})$$

El modelo de célula es capaz, por tanto, de predecir la influencia de la concentración de amonio en la evolución de los componentes intracelulares.

6.- El **Modelo Cinético Químicamente Estructurado** es capaz de predecir la evolución de los componentes del sistema, tanto los correspondientes al crecimiento como a la producción del polisacárido. Se ha obtenido por unión de los dos modelos anteriores, donde se han realizado diversas modificaciones, quedando el modelo completo formado por las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned} \frac{dC_X}{dt} &= \frac{dC_{RNA}}{dt} + \frac{dC_{DNA}}{dt} + \frac{dC_{PRI}}{dt} + k_{HC} \cdot C_X \\ \frac{dC_{RNA}}{dt} &= r_3 \\ \frac{dC_{DNA}}{dt} &= r_5 \\ \frac{dC_{PRI}}{dt} &= r_1 - \frac{dC_{PRE}}{dt} \\ \frac{dC_{NH_4^+}}{dt} &= 18 \cdot (-1,4 \cdot \frac{r_1}{136,5} - \frac{r_2}{103,5} - 2,75 \cdot \frac{r_3}{478,6} - 2,75 \cdot \frac{r_5}{491,7}) \\ \frac{dC_S}{dt} &= 180 \cdot \left\{ -\frac{5,94}{923,2} \cdot \frac{dC_P}{dt} - \frac{1}{12} \cdot \frac{k_4 \cdot C_{O_2}}{K_4 + C_{O_2}} \cdot C_X \cdot \left[1 - 3,58 \cdot \left(\frac{1 + 4 \cdot Y_{rp}}{3,58 + 4 \cdot Y_{ATPP}} \right) \right] \right\} \\ &\quad - 0,933 \left(\frac{r_1}{136,5} \right) - 0,5 \cdot \left(\frac{r_2}{103,5} \right) - 1,08 \cdot \left(\frac{r_3}{491,87} \right) - 1,12 \cdot \left(\frac{r_5}{486,7} \right) \\ \frac{dC_P}{dt} &= 923,2 \cdot \frac{k_4 \cdot C_{O_2}}{K_4 + C_{O_2}} \cdot \left(\frac{1 + 4 \cdot Y_{rp}}{3,58 + 4 \cdot Y_{ATPP}} \right) \cdot C_X \\ \frac{dC_{O_2}}{dt} &= -\frac{0,3}{923,2} \cdot \frac{dC_P}{dt} - 0,5 \cdot \frac{k_4 \cdot C_{O_2}}{K_4 + C_{O_2}} \cdot C_X + k_L a_v \cdot (C^* - C_{O_2}) - \frac{1}{Y_{OX}} \cdot \frac{dC_X}{dt} \\ r_4 &= \frac{k_4 \cdot C_{O_2}}{K_4 + C_{O_2}} \cdot C_X \cdot \left(\frac{1 + 4 \cdot Y_{rp}}{3,58 + 4 \cdot Y_{ATPP}} \right) \\ r_2 &= \frac{1}{12} \cdot \frac{k_4 \cdot C_{O_2}}{K_4 + C_{O_2}} \cdot C_X \cdot \left(1 - 3,58 \cdot \left(\frac{1 + 4 \cdot Y_{rp}}{3,58 + 4 \cdot Y_{ATPP}} \right) \right) \end{aligned}$$

$$Y_{np} = 1,2 \cdot \frac{C_{O_2}}{K_d + C_{O_2}}$$

$$Y_{ATPP} \approx 34$$

Siendo:

$$r_1 = k_1 \cdot C_N \cdot C_X$$

$$r_3 = k_3 \cdot C_N \cdot C_X$$

$$r_5 = k_5 \cdot C_N \cdot C_X$$

$$r_{2m} = k_2 \cdot C_N$$

y el valor de los parámetros:

$$k_1(T) = 1,49 - 0,036 \cdot T$$

$$k_3(T) = 0,150$$

$$k_5(T) = 0,198$$

$$k_{HC}(T) = 0,00108 - 0,00003 \cdot T$$

$$k_2(T) = \{ 0,041 \cdot (T - 21) \cdot [1 - \exp(0,352 \cdot (T - 35,08))] \}^2$$

$$k(T) = \{ 0,94 \cdot (T - 19,45) \cdot [1 - \exp(1,399 \cdot (T - 34,24))] \}^2$$

$$k'(T) = -2,913 + 2,048 \cdot T$$

$$Y_{OX}(T) = \{ 0,597 \cdot (T - 24,35) \cdot [1 - \exp(-0,205 \cdot (T - 37,16))] \}^2$$

$$Y_{XS}(T) = 0,340 + (-6,1 \cdot 10^{-3}) \cdot T$$

6.1.- El modelo químicamente estructurado predice de forma adecuada la evolución de los componentes intracelulares: DNA, RNA y proteínas en todos los experimentos realizados. Esto es evidente pues este modelo incluye las expresiones del modelo de célula, con lo que también será capaz de predecir la influencia de la temperatura y de la concentración de amonio en la evolución de estos componentes.

En la parte correspondiente a la producción, y dado que se han tomado las expresiones del modelo cinético metabólico, el modelo químicamente estructurado, predice adecuadamente en el consumo de sustrato, producción de xantano y evolución del oxígeno disuelto en el sistema.

Con este modelo se considera la evolución de otro componente intracelular no considerado en el modelo cinético de célula. Este componente se ha denominado hidratos de carbono, y el parámetro de la reacción de formación de este compuesto, k_{HC} , puede ser expresado también en función de la temperatura.

6.2.- El modelo químicamente estructurado predice de forma adecuada la evolución del sustrato carbonado, el producto y el oxígeno disuelto en todos los experimentos realizados, siendo capaz de predecir la influencia de cambios en las variables que afectan a la transferencia de oxígeno (agitación, k_{LAV} y caudal de aire) en la evolución del sustrato carbonado y del producto. Lo mismo que ocurre con el modelo metabólico (ver Figura 8.2).

6.3.- El modelo químicamente estructurado también toma en consideración la influencia de cambios en la composición del medio, como por ejemplo en la concentración de nitrógeno, sobre la producción del polisacárido. Se puede observar un máximo de producción en torno a las 200 y 250 p.p.m. de concentración inicial de amonio indicado en la Figura 8.3. Esta figura está realizada tomando la concentración de xantano alcanzada a las 60 horas de fermentación. Esta influencia, de nuevo, fue detectada experimentalmente en un trabajo previo (Santos, 1993; García-Ochoa y col., 1997).

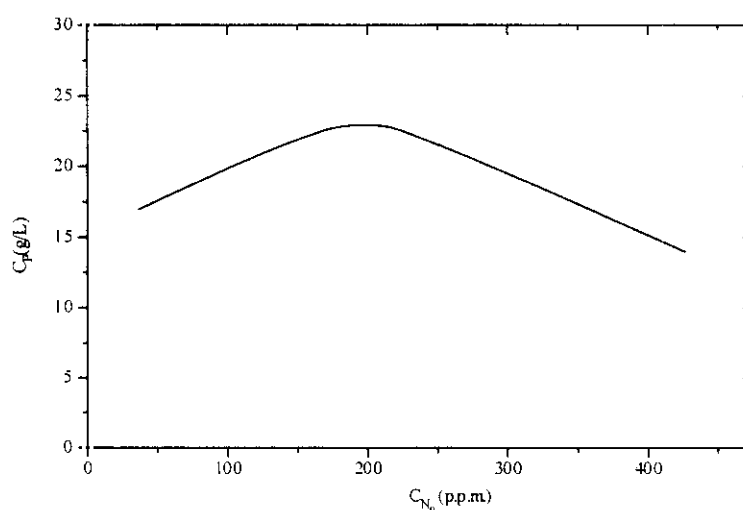


Figura 8.3.- Evolución de la concentración de xantano alcanzada a las 60 horas de fermentación con diferentes concentraciones iniciales de amonio.

9.- NOMENCLATURA

9.- NOMENCLATURA

A	:	Absorbancia (u.a.).
	:	Compartimento en los modelos de Bijkerk y Hall (1977) y de Nielsen y col. (1991a y 1991b).
B	:	Constante de Blackman (1905).
	:	Compartimento del modelo de Bijkerk y Hall (1977).
C	:	Concentración (kg/m^3).
	:	Vector de compuestos en el estudio estequiométrico
C_j	:	Concentración del compuesto j ($\text{mol j}/\text{L}$) ($\text{kg j}/\text{m}^3$).
C_1, C_2	:	Parámetros de la ecuación de Ratkowsky y col. (1983).
$C_1, C_2,$ C_3, C_4	:	Parámetros del modelo de Matsumura y col. (1981).
C_{sc}	:	Parámetro del modelo de Wayman y Tseng (1976) (kg/m^3).
C_m	:	Concentración de oxígeno en el momento en que se inicia la aireación (%).
CMF	:	Citometría de Flujo.
d	:	Diámetro de la hifa (m).
D	:	Compartimento del modelo de Ramkrishna y col. (1967).

e	:	Número total de elementos hifales por volumen de reactor (L^{-1}).
E_i	:	Enzima de la ruta i.
F	:	Parámetro estadístico, F de Fischer.
FD	:	Factor de Dilución.
G	:	Compartimento de los modelos de Ramkrishna y col. (1967); Harder y Röels (1982) y Nielsen y col. (1991a y 1991b).
IF	:	Intensidad de Fluorescencia (unidad arbitraria).
K	:	Parámetro del modelo de Hinshelwood (1946), (m^3/kg_p).
	:	Compartimento del modelo de Williams (1967) y del modelo de Harder y Röels (1982).
k_C	:	Parámetro del modelo reológico de Casson ($N^{1/2}s^{1/2}m^{-1}$).
k_I	:	Parámetro representativo de la inhibición en el modelo cinético de célula ($m^3 \cdot h^{-1} kg_s^{-1}$).
k_i	:	Parámetro representativo de la inhibición por sustrato en el modelo de Wayman y Tseng (1976), ($m^3 h^{-1} kg_s^{-1}$)
	:	Constante cinética de la reacción i (unidades dependientes de la función composición (h^{-1}) o ($m^3 h^{-1} kg_s^{-1}$)).
K_i	:	Constante de saturación de la expresión de Monod debido al compuesto limitante j ($kg\ i/m^3$).
	:	Constante cinética de la reacción i (h^{-1}) ($m^3 h^{-1} kg^{-1}$).
K_{ji}	:	Constante de saturación del compuesto j en la reacción i ($kg\ i/m^3$).
k_{LaV}	:	Coefficiente volumétrico de transporte de oxígeno (s^{-1}) (h^{-1}).
k_{01}, k_{02}	:	Factores preexponenciales en la ecuación de Esener y col. (1983).
	:	Factores preexponenciales en la ecuación de Shu y Yang (1991).
K_s	:	Parámetro ecuación de Monod (1949, 1950) (kg_s/m^3).
l_{hgu}	:	Unidad de crecimiento hifal referida a la longitud de la hifa (m/puntas).
M	:	Masa media del elemento hifal (g).
m_{hgu}	:	Unidad de crecimiento hifal referida a la masa de la hifa (g/puntas).
m_{02}	:	Consumo de oxígeno debido al mantenimiento celular ($kmol\ O_2/kg_X \cdot h$).
m_s	:	Consumo de sustrato carbonado debido al mantenimiento ($kg_s/kg_X \cdot h$).

N	:	Velocidad de agitación (r.p.m.).
n	:	Constante de la ecuación de Luedeking-Piret (1959) referido a la producción asociada al crecimiento (kg_p/kg_x).
	:	Número medio de puntas del elemento hifal.
N_A	:	Velocidad de transferencia de oxígeno ($\text{mol O}_2/\text{h}$).
NC	:	Número de Células.
	:	Número de componentes clave.
PI	:	Controlador proporcional-integral.
PID	:	Controlador proporcional-integral-diferencial.
Q	:	Caudal (cm^3/min) (m^3/h).
q_i	:	Velocidad específica de formación del compuesto i (modelo de Pons y col , 1989).
q_{O_2}	:	Consumo de oxígeno debido a los microorganismos ($\text{kmol O}_2/\text{kg}_x \cdot \text{h}$).
r^2	:	Parámetro estadístico, coeficiente de correlación lineal.
Re	:	Número de Reynolds ($\rho N T^2/\mu_{ef}$).
S	:	Sustrato.
Sc	:	Número de Schmidt ($\mu/\rho D_L$)
SRC	:	Suma de los residuos al cuadrado.
t	:	Tiempo (h).
	:	Parámetro estadístico, t de Student.
T	:	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$).
t_{lat}	:	Tiempo de latencia (h).
$T_{min}T_{max}$:	Parámetros del modelo de Ratkowsky y col.(1983) ($^{\circ}\text{C}$).
V	:	Volumen (L).
V_s	:	Caudal de aire aportado al fermentador, ($\text{IN}/\text{l}/\text{min}$) ($\text{m}^3/\text{m}^3/\text{h}$).
We	:	Número de Weber ($\rho N^2 T^3/\sigma$)

YE	:	Extracto de levadura.
Y_{ij}	:	Rendimiento macroscópico del compuesto j en el compuesto i (kg j/kg i).
Y_{O_2}	:	Consumo de oxígeno debido al crecimiento de la biomasa ($\text{kg}_x/\text{kmol O}_2$).
Y_{ps}	:	Rendimiento macroscópico del sustrato, S, respecto al producto sintetizado, P, (kg_p/kg_s).
Y_{xs}	:	Rendimiento macroscópico del sustrato, S, respecto a la biomasa sintetizada, X, (kg_x/kg_s).

Letras Griegas

α	:	Parámetro de la ecuación de Luedeking-Piret modificada, relativo al consumo de sustrato debido al mantenimiento y a la producción no asociada al crecimiento ($\text{kg}_s/\text{kg}_x \text{ h}$).
β	:	Parámetro de la ecuación de Luedeking-Piret modificada, relativa al consumo de sustrato debido al crecimiento del microorganismo y a la producción asociada al mismo (kg_s/kg_x).
γ_i	:	Coefficiente estequiométrico del compuesto i.
Δ	:	Incremento.
λ	:	Longitud de onda.
μ	:	Velocidad específica de crecimiento (h^{-1}).
μ_C	:	Viscosidad relativa al modelo de Casson (Pa.s).
μ_e	:	Viscosidad efectiva relativa al modelo de Ostwald-deWaele (Pa.s).
μ_m	:	Velocidad específica máxima de crecimiento ($\text{m}^3 \cdot \text{kg}_s \cdot \text{h}^{-1}$).
ρ	:	Densidad del líquido (kg/m^3).
σ	:	Tensión superficial ($\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$).
τ	:	Tensión tangencial ($\text{N} \cdot \text{m}^{-2}$) (kg/m.s^2).
τ_0	:	Tensión crítica de flujo ($\text{N} \cdot \text{m}^{-2}$) (kg/m.s^2).

Subíndices

b	:	Referido a biomasa.
c	:	Referido a catabolismo (modelo de Pons y col., 1989).
0	:	Condiciones iniciales.
crit	:	Referido al valor crítico.
DNA	:	Referido al DNA.
ef	:	Eficaz o medio.
exp	:	Experimental.
g	:	Referido a glucosa (modelo de Pons y col., 1989).
m	:	Referido a condiciones máximas.
	:	Referido a mantenimiento (modelo de Pons y col., 1989).
max	:	Referido al valor o a las condiciones máximas.
min	:	Referido al valor mínimo.
N	:	Referido al sustrato nitrogenado, amonio.
N,A	:	Referido al nitrógeno en amonio.
N,DNA:	:	Referido al nitrógeno en DNA.
N,RNA :	:	Referido al nitrógeno en RNA.
N,T	:	Referido al nitrógeno total.
O ₂	:	Referido al oxígeno.
P	:	Referido al producto, xantano.
PR	:	Referido a Proteínas.
PRE	:	Referido a proteína extracelular.
PRI	:	Referido a proteína intracelular.
PRT	:	Referido a proteína total.

- R : Referido a los cofactores (modelo de Pons y col., 1989).
- RNA : Referido al RNA.
- s : Referido al sustrato carbonado, sacarosa.
- Teor : Referido al valor teórico.
- x : Referido a la biomasa.
: Referido a xantano (modelo de Pons y col., 1989).

Superíndices

- A : Referido a absorbancia.
- CMF : Referido a Citometría de Flujo.
- F : Referido a Fluorimetría.
- * : Valor de saturación.

10.- BIBLIOGRAFÍA

10.- BIBLIOGRAFIA

Agar, D.W. y J.E. Bailey. 1982. "Cell cycle operation during batch growth of fission yeast populations". *Cytometry*. 3, 123-128.

Alberghina, L.; B.M. Ranzi; D. Porro y E. Martegani. 1991. "Flow cytometry and cell cycle kinetics in continuos and fed-batch fermentations of budding yeast". *Biotech. Prog.* 7, 299-304.

Alberghina, L., Porro, D. 1993. "Quantitative flow cytometry: analysis of protein distributions in Budding Yeast. A mini-review". *Yeast* 9, 815-823.

Albrecht, W. J.; S. P. Rogovin y E.L. Griffin. 1962. "Recovery of microbial polysaccharide B-1459 with quaternary ammonium compound". *Nature* 194, 1279-1283.

Allman, R., Hann, A.C., Phillips, K.L., Martin, K.L., Lloyd, D. 1990. "Growth of *Azotobacter vinelandii* with correlation of coulter size, flow cytometric parameters and ultrastructure". *Cytometry* 11, 822-831.

Arranz, M.A. 1993. "Transferencia de materia en columnas de burbujeo: clásicas y con recirculación". *Tesis Doctoral. Universidad de Alcalá de Henares*.

Aspinall, G.O.. 1982. "The Polysaccharides". *Academic Press. Londres*. 1, 1-4.

Aynsley, M.; A.C. Ward y A.R. Wright. 1990. "A Mathematical model for the growth of mycelial fungi in sumerged culture". *Biotech. Bioeng.* 35, 820-830.

Barford, J.P. 1990. "A general model for aerobic yeast: batch growth". *Biotech. Bioeng.* 35, 907-920.

Barford, J.P. y R.J. Hall. 1981. "A mathematical model for the aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* with saturated respiratory capacity". *Biotech. Bioeng.* 23, 1735-1762.

- Barford, J.P.; P.J. Phillips y J.H. Orlowski. 1992a.** "A new model of uptake multiple sugars by *Saccharomyces cerevisiae*" (Part I). *Bioprocess Eng.* **7**, 279-302.
- Barford, J.P.; P.J. Phillips y J.H. Orlowski. 1992b.** "A new model of uptake multiple sugars by *Saccharomyces cerevisiae*" (Part II). *Bioprocess Eng.* **7**, 303-307.
- Bailey J.E. 1977.** "Characterization of bacterial growth by means of flow microfluorimetry". *Science* **17**, 1175-1176.
- Bailey, J.E., Fazel-Madjlessi, J., McQuitty, D.N., Lee, L.Y.; Oro, J.A. 1978.** "Measurement of structured microbial population dynamics by flow microfluorimetry". *AIChE J.* **24**, 570-577.
- Bailey, J.E. y D.F. Ollis. 1986.** "Biochemical engineering fundamentals". *Mc.Graw-Hill*.
- Bailey, J.F. 1991.** "Toward a science of metabolic engineering". *Science* **252**, 1668-1675
- Bailey, J.E. 1995.** "Chemical engineering of celular processes". *Chem. Eng. Sci.* **24**, 4091-4108.
- Bibila, T. y M.C. Flikinger. 1991.** "A structured model for monoclonal antibody syntesis in exponentially growing and stationary phase hibridoma cells". *Biotech. Bioeng.* **37**, 210-226.
- Bijkerk, A.H.E. y R.J. Hall. 1977.** "A mechanistic model of the aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*". *Biotech. Bioeng.* **19**, 267-296.
- Blackman, F.F. 1905.** *Ann. Bot.* **19**, 281. (citado por Esener y col., 1983; Röels y Kossen, 1978).
- Bleecken, S. 1984.** "A minimal model of bacterial growth". *Studia Biophysica* **101**, 153-159.
- Bouniot, A. 1976.** U.S. Patent. 3988313.
- Bourne, J.R.; E.P. Zurita y E. Heinzle. 1992.** "Biorreactor scale-up for the oxygen-sensitive culture *Bacillus subtilis*: The influence of stirrer shaft geometry". *Biotech. Prog.* **8**, 580-582.
- Boye, E., Steen, H.B., Skarstad, K. 1983.** "Flow cytometry of bacteria a promising tool in experimental and clinical microbiology". *J. Gen. Microbiol.* **129**, 973-987.
- Bradbury, J.F. 1984.** "Genus II: *Xanthomonas*". en Krieg, N. R. y C. G. Holt. (Edts): "Manual of Systematic Bacteriology". *Williams & Wilkings. Baltimore. Londres.* **1**, 199-210.
- Brown, D.E. y M.A. Zainudeen. 1977,** "Growth kinetic and cellulase biosynthesis in the continuous culture of *Trichoderma viride*". *Biotech. Bioeng.* **19**, 941-958.
- Cadmus, M.C.; S.P. Lagoda; K.A. Burton; J.F. Pittsley; C.A Knutson y A. Jeanes. 1976.** "Colonial variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 and characterization of the polysaccharide from a variant strain". *Can. J. Microbiol.* **22**, 942-948.

- Cadmus, M.C.; C.A. Knutson; A.A. Lagoda; J.E. Pittsley y K.A. Burton. 1978.** "Synthetic Media for production of quality xanthan gum in 20 liter fermentors". *Biotech. Bioeng.* **20**, 1003-1014.
- Casas, J.A. 1989.** "Propiedades reológicas de disoluciones de polisacáridos: xantano, goma de garrofin y sus mezclas". *Tesis de Licenciatura. Universidad Complutense de Madrid.*
- Casas, J.A.; V.E. Santos y F. García-Ochoa. 1999.** "Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties".(enviado)
- Cho, M.H. y S.S. Wang. 1990.** " Practical method for estimating oxygen kinetics and metabolic parameters". *Biotech. Prog.* **6**, 164-167.
- Cortassa, S. y M.A. Aon. 1994.** " Metabolic control analysis of glycolysis and branching to etanol production in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae* under carbon, nitrogen or phosphate limitations". *Enz. Microbiol. Technol.* **16**, 761-770.
- Costa, E.; A. Lucas; J. Aguado; J.A. Ávila. 1982a.** "Transferencia de materia en tanques agitados: burbujeo de gases en líquidos newtonianos y no newtonianos. I. Turbinas de 6 paletas y difusor plano". *An. Quim.* **78**, 387-392.
- Costa, E.; A. Lucas; J. Aguado; J.A. Ávila. 1982b.** "Transferencia de materia en tanques agitados: burbujeo de gases en líquidos newtonianos y no newtonianos. II. Generalización de los resultados. Areas interfaciales específicas". *An. Quim.* **78**, 393-398.
- Cottrel, I.W. y K.S. Kang. 1978.** "Xanthan gum, A unique bacterial polysaccharide for food applications". *Dev. Ind. Microbiol.* **19**, 117-131.
- Crissman, H.A., Z. Darzynkiewicz;; R.A., Tobey; J.A., Steinkamp. 1985.** "Correlated measurements of DNA, RNA and protein in individual cells by flow cytometry". *Science* **228**, 1321-1324.
- Danckwerts, P.V. y A.J. Gillham. 1966.** " The design of gas absorbers: I.- Methods for predicting rates of absorption with chemical reaction in packed columns, and tests with 11/2in. Raschig rings". *Trans. Instn. Chem. Engrs.* **44**, T42-T54.
- Danckwerts, P.V.. 1970.** "Gas-Liquid Reaction". *McGraw-Hill, New York.*
- Davidson, I.W. 1978.** "Production of polysaccharide by *Xanthomonas campestris* in continuous culture". *FEMS Microbiol. Lett.* **3**, 347-349.
- Dean, A.C.R. y C.N. Hinshelwood. 1966.** " Growth function and regulation in bacterial cell" *Oxford University Press. Londres.*
- Delgado, J.; Meruane, J.; Liao, J.C. 1993.** "Experimental determination of flux control distribution in biochemical Systems: In vitro model to analyze transient metabolite concentrations". *Biotech. Bioeng.* **41**, 1121-1128.

De Jong-Gubbels, P.; Vanrolleghem, P.; Meijnen, S.; Van Dijken, J.P.; Pronk, J.T. **1995**. "Regulation of carbon metabolism in chemostat cultures on mixtures of glucose and ethanol". *Yeast* **11**, 407-418.

De Noronha-Pissara, P.; J., Nielsen; M.J. Bazin. **1996**. "Pathway kinetics and metabolic control analysis of a high-yielding strain of *Penicillium chrysogenum* during fed-batch cultivations". *Biotech. Bioeng.* **51**, 168-176.

De Vuyst, L.; A. Vermeire; J. Van Loo y E. J. Vandamme. **1987a**. "Nutritional, physiological and process-technological improvements of xanthan fermentation process". *Mec. Fac. Landbouww. Rijkuniv. Gent.* **52**, 1881-1900.

De Vuyst, L.; J. Van Loo y E.J. Vandamme. **1987b**. "Two-step fermentation process for improved xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459". *J. Chem. Tech. Biotech.* **39**, 263-273.

Domach, M.M.; S.K. Leung; R.E. Cahm; G.C. Cocks y M.L. Shuler. **1984**. "Computer model for glucose limited growth of a single cell of *Escherichia coli* B/r-a". *Biotech. Bioeng.* **26**, 203-216.

Donnelly, C.W.; G.J., Baigent. **1986**. "Method for flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes* in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 689-695.

Dussap, C.G. y J.B. Gros. **1985**. "Fermenteurs agités sans organes d'agitation mécanique. application à production de polysaccharides exocellulaires". *Bull. Soc. Chim. France.* **6**, 1075-1082.

Eakman, J.M.; A.G. Fredrickson y H.M. Tsuchiya. **1966**. "Statistics and dynamics of microbial cell population". *Chem. Eng. Prog. Sym. Ser.* **62**, 37.

Esener, A.A.; T. Veerman; J.A. Röels y N.W.F. Kossen. **1982**. "Modelling of bacterial growth. formulation and evaluation of a structured model". *Biotech. Bioeng.* **24**, 1749-1764.

Esener, A.A.; J.A. Röels y N.W. F. Kossen. **1983**. "Theory and application of unstructured growth models : kinetics and energetics aspects". *Biotech Bioeng.* **25**, 2803-2841.

Fazel-Madjlessi, J. y J.E, Bailey. **1979**. "Analysis of fermentation processes using flow microfluorometry: single-parameter observations of batch bacterial growth". *Biotech. Bioeng.* **21**, 1995-2010.

Fell, D.A. **1992**. "Metabolic control analysis: a survey of its theoretical and experimental development". *Biochem. J.* **286**, 313-330.

Fell, D.A. y Sauro, H.M. **1995**. "Metabolic control and its analysis additional relationships between elasticities and control coefficients". *Eur. J. Biochem.* **148**, 555-561.

Fernández, A. **1991**. "Aislamiento y purificación del xantano". *Tesis de Licenciatura. Universidad Complutense de Madrid.*

- Figueiredo, L.M. y P.H. Calderbank. 1979.** "The scale-up of aerated mixing vessels for specified oxygen dissolution rates". *Chem. Eng. Sci.* **34**, 1333-1338.
- Frelat, G. y C. Laplace-Builhé. 1990.** "Microbial analysis by flow cytometry: present and future. In: flow cytometry advanced research and clinical applications". *CAC Press Inc. Boca Raton, F.L.* **2**, 225-279.
- Froment, G.F. 1975.** "Model discrimination and parameter estimation in heterogeneous catalysis". *AIChE J.* **21**, 1041-1057
- Funahashi, H.; T. Yoshida; H. Taguchi. 1987.** "Effect of glucose concentration on xanthan gum production by *Xanthomonas campestris*". *J. Ferment. Technol.* **65**, 603-606.
- Funahashi, B. y Y. Mahedara. 1987.** "Effects of agitation by flat-bladed turbine impeller on microbial production of xanthan gum". *J. Chem. Eng. Japan.* **20**, 16-22.
- Gaden, E.L. 1959.** "Fermentation process kinetic". *J. Biochem. Microbiol. Tech. Eng.* **1**, 413-429.
- Galindo, E. 1988.** "La goma xantana: un polisacárido microbiano obtenido del azúcar con extraordinarias propiedades y variadas aplicaciones". *Boletín GEPLACEA.* **5**, 9.
- Galindo, E. y R. Herrera. 1989.** "Effects of different impeller combinations and agitation speeds on the culture of a highly oxygen-sensitive bacteria". *Chem. Eng. J.* **42**, B9-B12.
- García-Ochoa, F.; A. Romero; J. Querol. 1989a.** "Modeling of the termal n-octano oxidation in the liquid phase". *Ind.Eng.Chem. Res.* **28**, 43--48.
- García-Ochoa, F.; A. Romero; V.E. Santos; C.O. Rodriguez. 1989b.** "Estudio del método diferencial en la determinación de modelos cinéticos en reacciones complejas". *An. Quim.* **85**, 542-556.
- García-Ochoa, F.; J.Querol y A. Romero. 1990a.** "Modeling the Liquid-Phase n-Octane Oxidation Catalized by Cobalt". *Ind.Eng.Chem. Res.* **29**, 1989-1994.
- García-Ochoa, F.; M.A. García y A. Romero. 1990b.** "Comparación de métodos de determinación de parámetros cinéticos en reacciones complejas". *An. Quim.* **86**, 625-637.
- García-Ochoa, F; V.E. Santos y A. P. Fritsch. 1992.** "Nutritional study of *Xanthomonas campestris* in xanthan gum production by factorial design of experiments". *Enz. Microb. Technol.* **14**, 991-996.
- García-Ochoa, F. y J.A. Casas. 1993.** "Apparent yield stress in xanthan gum solutions at low concentration". *Chem. Eng. J.* **53**, B41-B46.
- García-Ochoa, F. y A. Romero. 1993.** "Kinetic modeling of reactions networks ". "Trends in Chemical Engineering" Ed Council of Sci. Res. Int. **1**, 285-305.
- García-Ochoa, F.; J.A. Casas; A.F. Mohedano. 1993.** "Xanthan precipitation from solutions and fermentation broths". *Sep. Sci. Technol.* **28** , 1303-1313.

- García-Ochoa, F.; y V.E. Santos. 1994a.** "Cinética de transformaciones usando microorganismos I: modelos cinéticos no estructurados". *An. Quim* **90**, 7-17.
- García-Ochoa, F.; y V.E. Santos. 1994b.** "Cinética de transformaciones usando microorganismos I: modelos cinéticos estructurados y segregados ". *An. Quim* **90**, 17-30.
- García-Ochoa, F.; V.E. Santos y A. Alcón. 1995a.** "Xanthan gum production an unstructured kinetic model. *Enz. Microbiol. Technol.* **17**, 206-217.
- García-Ochoa, F.; V.E. Santos y A. Alcón. 1995b.** "Simulation of xanthan gum production by a chemically structured kinetic model" *First Internat. Symp Mathem. Model. & Simulat. In Agriculture & Bioindustries*. Bruselas..
- García-Ochoa, F.; V.E. Santos y A. Alcón. 1997.** "Xanthan gum production in a laboratory aereated stirred tank bioreactor". *Chem. Biochem. Eng. Q.* **11**, 69-74.
- García-Ochoa, F.; V.E. Santos y A. Alcón. 1998.** "Intracellular compounds quantification by means of flow cytometry in bacteria; application to xanthan production by *Xanthomonas campestris*". *Biotech. Bioeng.* **57**, 87-97.
- García-Ochoa, F; E. Gómez . 1998.** " Mass transfer coefficient in stirred tank reactors for xanthan gum solutions". *Biochem. Eng J.* **1**, 1-10
- García-Ochoa, F.; V.E. Santos J.A.Casas. 1999a.** "Kinetic modeling of microbial processes" *Rec. Res. Develop. Chem. Eng.* (en prensa).
- García-Ochoa, F.; V.E. Santos y E. Gómez. 1999b.** "Oxygen transfer and uptake rates during xanthan gum production. " (enviado)
- García-Ochoa, F.; V.E. Santos J.A.Casas. 1999c.** "Production and isolation of xanthan gum" in "*Carbohydrate Biotechnology*" (en prensa).
- Gao, J. y J.M. Lee. 1992.** "Effect of oxygen supply on the suspension culture of genetically modified tobacco cells". *Biotech. Prog.* **8**, 285-290.
- Geraats, S.G.M.; C.M. Hooijmans; E.W.J. Van Niel; L.A. Robertson; J.J. Heijnen; K.Ch. A.M. Luyben y J. G. Kuenen. 1990.** " The use of a metabolically structured model in the study of growth, nitrification and denitrification of *Thiosfera panthotropha*". *Biotech. Bioeng.* **36**, 921-930.
- Goel, A.; J Ferrance; J. Jeong. y M.M. Ataii 1993.** " Analysis of metabolic fluxes in batch and continuous cultures of *Bacillus subtilis*". *Biotech. Bioeng.* **42**, 686-696.
- Gómez, E. 1995.** "Transferencia de oxígeno en biorreactores tipo tanque agitado.: aplicación a la producción de xantano". *Tesis Doctoral, U.C.M.*
- Gulik, W.M.V y J.J. Heijnen. 1995.** " A metabolic network stoichiometry analysis of microbial growth and product formation". *Biotechl. Bioeng.* **48**, 681-698.

- Hall, R.J. y J.P. Barford. 1981. "Simulation of the integration of the internal energy metabolism and the cell cycle of *Saccharomyces cerevisie*". *Biotech. Bioeng.* 23, 1763-1795.
- Hamer, J.W. 1989. "Stoichiometric interpretation of multireaction data: application to fed-batch fermentation data". *Chem. Eng. Sci.* 44, 2363-2374.
- Harder, A. y J.A. Röels. 1982. "Application of simple structured models in bioengineering". *Adv. Biochem. Eng.* 21, 55-107.
- Hassler, R.A y D.H. Doherty. 1990. "Genetic engineering of polisacharide structure: production of variant of xanthan gum in *Xanthomonas campestris*". *Biotech. Prog.* 6, 182-187.
- Heinrich, R.y T.A Rapoport. 1974. "A Linear steady-State treatment of enzymatic chains: general properties, control and effector strength". *Eur. J. Biochem.* 42, 89-95.
- Herbert, D. 1958. "Continuous cultivation of microorganisms. A symposium". (I. Málek, ed.) *Czech. Acad. Sci. Praga.* 44-52.
- Herbst, H; A. Shumpe y W.D. Deckwer. 1992. "Xanthan production in stirred tank fermenters: oxygen transfer and scale-up". *Chem. Eng. Technol.* 15, 425-434.
- Higgins, I.J.; D.J. Best y J. Jones. 1985. "Biotechnology: principles and applications". *Blackwell Scientific Publications. Oxford, Londres*
- Himmelblau, D.M; C.R. Jones y K.B. Bischoff. 1967. "Determination of rate constant for complex kinetics models". *Ind. Eng. Chem. Fundam.* 4, 539-543.
- Hinshelwood, C.N. 1946. "The chemical kinetics of bacterial cell". *Oxford University Press*.
- Horton, D.; O. Hols; Z. Walaszak y W.C. Wernau. 1985. "Structural and biosynthetic studies on xanthan by ¹³C-N.M.R. spectroscopy". *Carbohydr. Res.* 141, 340-346.
- Hofmann, H. 1972. "Industrial process kinetics and parameter estimation." *Adv. Chem. Ser.* 109, 519-534.
- Hullet, H.R., W.H., Bonner; J. Barret y P. Herzenber. 1969. "Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science* 166, 747-752.
- Hutter, K. J. y H.E. Eipel, 1978. "Flow cytometric determinations of cellular substances in algae, bacteria, moulds and yeast". *Ant. Van Leeuwen.* 49, 269-280.
- Hutter, K.J.y H. E Eipel. 1979. "Microbial determinations by flow cytometry". *J. Gen. Microbiol.* 113, 369-376.
- Ielpi, L.; R. Couso y M. Dankert. 1981a. "Lipid-linked intermediates in the biosynthesis of xanthan gum". *FEBS Lett.* 130, 253-256.

Ielpi, L.; R. Couso y M. Dankert. 1981b. "Pyruvic acid acetal residues are transferred from phosphoenolpyruvate to the pentasaccharide-P-P-lipid". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 102, 1400-1408.

Inkson, M.B. 1979. (Tate & Lyle) European Patent. 0028446.

Jansson, P-E.; L. Kenne y B. Lindberg. 1975. "Structure of extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*". *Carbohydr. Res.* 45, 275-282.

Jeong, J.W.; J. Snay y M.M. Ataai. 1990. "A mathematical model for examining growth and sporulation processes of *Bacillus subtilis*". *Biotech. Bioeng.* 35, 160-184.

Jeanes, A.; P. Rogovin; M.C. Cadmus; R.W. Silman y C.A. Knutson. 1976. "Polysaccharide (xanthan) of *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459: procedures of culture maintenance and polysaccharide production purification and analysis". *Agricultural Research Service. U.S. Department of Agriculture. ARS-NC-51*.

Jorgensen, H.; Nielsen, J.; Villadsen, J. y Møllgaard, M.M. 1995. "Metabolic flux distributions in *Penicillium crysogenum* during fed-batch cultivation". *Biotech. Bioeng.* 46, 117-131.

Kang, K.S. y D.J. Pettit, 1993. "Xanthan, gellan, wellan, and rhamnan" en "Industrial Gums". Ed: Whistler, R.L y J.M. Bemiller. *New York and London. Academic Press, Inc.* 341-398.

Kawase, Y.; B. Halard y M. Moo-Young. 1992. "Liquid-phase mass transfer coefficients in bioreactors". *Biotech. Bioeng.* 39, 1133-1140.

Kell, D.B. y H.V. Westerhoff. 1987. "Metabolic control theory: its role in microbiology and biotechnology". *FEMS Microb. Rev.* 39, 305-320.

Kennedy, J.F.; P.Jones; S.A. Barker y G.T. Banks. 1982. "Factors affecting microbial growth and polysaccharide production during the fermentation of *Xanthomonas campestris* cultures". *Enz. Microbiol. Technol.* 4, 39-43.

Kennedy, J.F. y I.J. Bradshaw, 1984. "Production, properties and applications of xanthan". *Prog. Ind. Microbiol.* 19, 319-371.

Kessler, W.R.; M.K. Popovic y C.W. Robinson. 1993. "Xanthan production in an external-circulation-loop airlift fermenter". *Can. J. Chem. Engng.* 71, 101-106.

Kidby, D.; Sandford; A. Herman y M.C. Cadmus. 1977. "Maintenance procedures for the curtailment of genetic instability: *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459". *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 840-845.

Kittrell, J.R. 1970. "Mathematical modeling of chemical reactions". *Adv. Chem. Eng.* 8, 97-183.

- Kobayashi, J. 1966. "The fermentation characteristics from the point of view of apparent ages and its application to continuous fermentation". *J. Ferment. Technol.* 44, 233-244.
- Koga, S.; I. Kagami e I.C. Kao. 1969. "Fermentation Advances Proc.". Ed: D. Perlman. 3rd Fermentation Symposium New Brunswick Academic Press. Londres.
- Krebsler, U.; H-A. Moyer y A. Fletcher. 1988. "A comparison between the performance of continuously stirred-tank bioreactors and a TORUS bioreactor with respect to highly viscous culture broths". *J. Chem. Tech. Biotech.* 43, 107-116.
- Leckie, F.; A.H. Scragg y K.C. Cliffe. 1991a. "Effect of bioreactor design and agitator speed on the growth and alkaloid accumulation by cultures of *Catharanthus roseus*". *Enz. Microb. Technol.* 13, 296-305.
- Leckie, F.; A.H. Scragg y K.C. Cliffe. 1991b. "An investigation into the role of initial K_La on the growth and alkaloid accumulation by cultures of *Catharanthus roseus*". *Biotech. Bioeng.* 37, 364-370.
- Lee, P.K.; H.N. Chang y B.H. Kim. 1989. "Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in continuous fermentation". *Biotech. Lett.* 11, 573-578.
- Liao, J.C. y J. Delgado. 1993. "Advances in metabolic control analysis". *Biotech. Prog.* 9, 221-223.
- Linek, V. y V. Vacek. 1988. "Volumetric mass transfer coefficient in stirred reactors". *Chem. Eng. Technol.* 11, 249-251.
- Linek, V.; T. Moucha; M. Dousova y J. Sinkule. 1994. "Measurement of K_La_v by dynamic pressure method in pilot-plant fermentor". *Biotechnol. Bioeng.* 43, 477-482.
- Lowry, O.H.; R.J. Rosebrough; A.L. Farr y R.J. Randal. 1951. "Protein measurement with the folin-phenol Reagent". *J. Biol. Chem.* 193, 265-266.
- Luedeking, R. y E.L. Piret. 1959. "A kinetic study of the lactic acid fermentation batch process at controlled pH". *J. Biochem. Microbial. Technol. Eng.* 1, 393-412.
- Maftah, A.; O. Huet; P-F. Gallet y M-H. Ratinaud. 1993. "Flow cytometry's contribution to the measurement of cell functions". *Biol. Cell.* 78, 85-93.
- Maniatis, T., Fritsch y E.F., Sambrook. 1983. "Molecular cloning, a laboratory manual". Cold Spring Harbor laboratory. 468-475.
- Margaritis, A. y J.E. Zadic. 1978. "Biotechnology review: mixing, mass transfer and scale-up of polysaccharide fermentations". *Biotech. Bioeng.* 20, 939-1001.
- Marquardt, A.W., 1963. "An algorithm for least-squares estimation of non-linear parameters". *J. Soc. Indus. Appl. Math.* 11, 431-441.
- Markl, H.; R., Bronnenmeier y B., Wittek. 1991. "Resistance of microorganism to hydrodynamic stress". *Inter. Chem. Engng.* 31, 185-197.

Martegani, E.; D. Porro; B.M., Ranzi y L. Alberghina. 1990. "Involment of a cell size control mechanism in the induction and maintenance of oscillations in continuous cultures of budding yeast". *Biotech. Bioeng.* **36**, 453-459.

Matsumura, M; S. Mutaka; H. Yoshitome y J. Kobayashi. 1973. " Analysis of cell behaviour in transient state of continuous culture with an apparent age model". *J. Ferment. Technol.* **51**, 904-910.

Matsumura, M; S. Mutaka; y J. Kobayashi. 1981. "A fractal model for the chracterization of micelial morphology". *J. Ferment. Technol.* **59**, 115-123.

Meijer, J.J. 1989. "The effects of hydrodynamyc and chemical/osmotic stress on plant cells in a stirred bioreactor". *Tesis Doctoral , Delft University of Technology, The Netherlands.*

Meijer, J.J.; H.J.G. ten Hoopen; Y.M. van Gameren; K.Ch.A.M. Luyben y K.R. Libbenga. 1994. "Effects of hydrodynamic stress on the growth of plant cells in batch and continuous culture". *Enz. Microb. Technol.* **16**, 467-477.

Merchuk, J.C. 1991. "Shear effects on suspended cells". *Adv. Biochem. Eng.* **44**, 65, 1-31.

Merchuk, J.C.; G. Osemberg; M. Siegel y M. Shacham. 1992. "A method for evaluation of mass transfer coefficients in the different regions of air lift reactors". *Chem. Eng. Sci.* **47**, 9-11, 2221-2226.

Merchuk, J.C.; N. Ladwa; A. Cameron; M. Bulmer y A. Pickett. 1994. "Concentric-tube airlif reactors: effects of geometrical design on performace". *AIChE. J.* **40**, 1105-1117.

Mihail, R.; S. Staha; G.H. Maria; G. Musca y G. R. Pop. 1983. " A kinetic model for methanol conversion to hydrocarbons". *Chem. Eng. Sci.* **38**, 1581-1591.

M'Kendrick A.G. y M.K. Pai. 1910-11. *Proc. Roy. Soc. Edinburg.* **31**, 649-655. (citado por Tsuchiya y col., 1966)

Moes, J.; M. Griot; J. Keller; E. Heinzle; I.J. Dunn y J.R. Bourne. 1985. "A microbial culture with oxygen sensitive product distribution as a potential tool for characterizing bioreactor oxygen transport". *Biotech. Bioeng.* **27**, 482-489.

Monod, J. 1949. " The growth of bacterial cultures". *Ann. Rev. Microbiol.* **3**, 371-394.

Monod, J. 1950. " La technique de culture continue theorie et applications". *Ann. L'Institut Pasteur.* **79**, 390-410.

Moo-Young, M y H.W. Blanch. 1987. "Transport phenomena and bioreactor design". en *"Basic Biotechnology". Eds: J. Bu'lock y B. Kristiansen. Academic Press. Londres. Cap. 5, 148-150.*

Montes, F.J.; J. Catalán y M. Galán. 1998. " A methabolic model describing growth and substrate uptake of *Trigonopsis variabilis*" *Enz. Microb. Technol.* **22**, 329-334.

- Moraine, R.A. y P. Rogovin. 1966. "Kinetics of polysaccharide B-1459 fermentation". *Biotech. Bioeng.* 8, 511-524.
- Moraine, R.A. y P. Rogovin. 1971. "Xanthan biopolymer production at increased concentration by pH control". *Biotech. Bioeng.* 13, 381-391.
- Moraine, R.A. y P. Rogovin. 1973. "Kinetics of the xanthan fermentation". *Biotech. Bioeng.* 15, 225-237.
- Nebe-von Caron, G. y R.A. Badley. 1995. "Viability assessment of bacteria in mixed populations using flow cytometry". *J. Microscopy.* 179, 55-66.
- Nielsen, J.; K. Nikolajsen y J. Villadsen. 1991a. "Structured modeling of a microbial system : I. A theoretical study of lactic acid fermentation". *Biotech. Bioeng.* 38, 1-10.
- Nielsen, J.; K. Nikolajsen y J. Villadsen. 1991b. "Structured modeling of a microbial system : II. experimental verification of a structured lactic acid fermentation model". *Biotech. Bioeng.* 38, 11-23.
- Nielsen, J y J. Villadsen. 1992. "modelling of microbial kinetics". *Chem. Eng. Sci.* 47, 4225-4270.
- Nielsen, J. 1993. "A simple morphology structured model describing de growth of filamentous microorganisms". *Biotech. Bioeng.* 41, 715-727.
- Nielsen, J. y J. Villadsen. 1994. "Bioreaction engineering principles". *Plenum Press. New York and London*.
- Nikolajsen, K.; J. Nielsen y J. Villadsen. 1991. "Structured modeling of a microbial system: III. Growth on mixed substrates". *Biotech. Bioeng.* 38, 24-29.
- Nishikawa, M.; M. Nakamura; H. Yagi y K. Hashimoto. 1981a. "Gas absorption in aerated mixing vessels". *J. Chem. Eng. Jan.* 14, 219-226.
- Nishikawa, M.; M. Nakamura; K. Hashimoto. 1981b. "Gas absorption in aerated mixing vessels with non-Newtonian liquid". *J. Chem. Eng. Jpn.* 14 (3), 227-232.
- Nocentini, M.; D. Fajner; G. Pasquali y F. Magelli. 1993. "Gas-liquid mass transfer and holdup in vessels stirred with multiple rushton turbines: water and water-glycerol solutions". *Ind. Eng. Chem. Res.* 32, 19-26.
- Noorman, H.J.; Heijnen, J.J.; Luyben, K.Ch.A.M. 1991. "Linear Reactions in Microbial Reaction Systems: A General Overview of their Origin, Form and Use". *Biotech. Bioeng.* 38, 603-618.
- Ogut, A. y R.T. Hatch. 1988. "Oxygen transfer newtonian and non newtonian fluids in mechanically agited vessels". *Can. J. Chem. Eng.* 66, 79-85.
- Onken, U.; R. Sick y P. Weiland. 1985. "Determination of gas-liquid mass transfer by oxidation of hidrazine". *Chem. Eng. Sci.* 40, 1990-1993.

Paau, A.S. y J.R. Cowles. 1977. "Flow microfluorometric analysis of *E. coli*, *Rhizobium militoti* and *Rhizobium japonicum* at different stages of growth cycle". *J. Can. Microbiol.* **23**, 1165-1172.

Pace, G.W. y R.C. Righelato. 1980 "Production of extracellular microbial polisaccharydes" *Adv. Biochem. Eng.* **5**, 41-70.

Pace, G.W. 1987. "Microbial gums" en "*Basic Biotechnology*". Eds: J. Bu'lock y B. Kristinasen. Academic Press. Londres. Cap: **17**, 449-462.

Pamment, N.B.; R.J. Hall y J.P. Barford. 1978. "Mathematical model of lag phases in microbial growth". *Biotech. Bioeng.* **20**, 349-381.

Patankar, D.B.; T. Liu y T. Oolman. 1993. "A fractal model for the chracterization of micelial morphology" *Biotech. Bioeng.* **42**, 571-578.

Patton, J.T. y S.K. Dugar. 1981. "Growth kinetics of *Xanthomonas campestris* B-1459". *Process Biochemistry.* Aug/Sept. **46-49**.

Patton, J.T. y W.E. Holman. 1968. (Esso Prod. Res. Co.) U.S. Patent. 3383339.

Pedersen, A. G.; H. Andersen; J. Nielsen y J. Villadsen. 1994. "A novel technique based on Kr-85 for quantification of gas-liquid mass transfer in bioreactors". *Chem. Eng. J.* **6**, 803-810.

Peretti, S.W. y J.E. Bailey. 1986. "Mechanistically detailed model of cellular metabolism for glucose-limited growth *Escherichia coli* B/r-A". *Biotech. Bioeng.* **28**, 1672-1689.

Peters, H-U.; H. Herbst; P.G.M. Hesselink; H. Lündsdorf; A. Schumpe y W-D. Deckwer. 1989. "The influence of agitation rate on xanthan production by *Xanthomonas campestris*". *Biotech. Bioeng.* **34**, 1393-1397.

Peters, H-U.; I.S.. Suh; A. Schumpe y W-D. Deckwer. 1989. "The Piruvate content of xanthan polisaccharide produced under oxygen limitation". *Biotech. Lett.* **15**, 565-566.

Pettit, D.J. 1979. "Xanthan gum". *Polysaccharides in Food.* **6**, 263-282.

Petit, J.M.; M., Denis-Gay, M. y M.H. Ratinaud. 1993. "Assessment of fluorochromes for cellular structure and function studies by flow cytometry". *Biol. Cell.* **78**, 1-13.

Pinches, A. y L.J. Pallent. 1986. "Rate and yield relationships in the production of xanthan gum by batch fermentations using complex and chemically defined growth media". *Biotech. Bioeng.* **28**, 1484-1496.

Pinder, A.C.; P.W., Purdy; S.A.G. Poulder y D.C. Clark. 1990. "Validation of flow cytometry for rapid enumeration of bacterial concentrations in pure cultures". *J. Appl. Bacteriol.* **69**, 92-100.

- Pirt, S.J. 1965. "Maintenance energy of bacteria in growing cultures" *Proc. Roy. Soc. London. B.* 163, 224-231.
- Pons, A.; C.G. Dussap y J.B. Gros. 1989. "Modelling *Xanthomonas campestris* batch fermentations in a bubble column". *Biotech. Bioeng.* 33, 394-405.
- Pons, A.; C.G. Dussap y J.B. Gros. 1990. "Xanthan batch fermentations: compared performance of a bubble column and a stirred tank fermentor". *Bioproc. Eng.* 5, 107-114.
- Pons, A.; D.G. Dussap; C. Pequignot y J.A. Gros. 1996. "Metabolic flux distribution in *Corynebacterium melassicola* ATCC 17965 for various carbon sources". *Biotech. Bioeng.* 51, 177-189.
- Poizat, T.; C. Jallut; A. Accary y J. Lieto. 1992. "A novel experimental technique for measurement of mass transfer between liquids and gas bubbles in agitated vessels: application to highly viscous liquids". *Chem. Eng. J.* 48, 41-48.
- Qadeer, M.A. y S. Baig. 1989. "Effect of nitrogen sources on the production of exocellular biopolysaccharide by *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459". *Sci. Int. (Lahore)*. 14, 262-264.
- Quinlan, A.V. 1986. "Kinetics of secondary metabolite synthesis in batch culture when two different substrates limit cell growth and metabolite production: xanthan synthesis by *Xanthomonas campestris*". *Biochem. Engng. IV Ann. N.Y. Acad. Sci.* 469, 259-269.
- Quintero, R. 1981. "Ingeniería Bioquímica". Ed. Alhambra Mexicana S.A.
- Rane, K.D. y K.A. Sims. 1994. "Oxygen uptake and citric acid production by *Candida lipolytica* Y 1095". *Biotech. Bioeng.* 43, 131-137.
- Ratkowsky, D.A.; R.K. Lowry; T.A. Stokes y R.E. Chandler. 1983. "Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range". *J. Bacteriol.* 154 (3), 1222-1226.
- Reder, C. 1988. "Metabolic control theory: a structural approach". *J. Theor. Biol.* 135, 175-201.
- Röels, J.A. y N.W. F. Kossen. 1978. "On the modelling of microbial metabolism". *Prog. Ind. Microbiol.* 14, 95-203.
- Rocks, J.K. 1971. "Xanthan gum". *Food Technol.* 25, 476-483.
- Rogovin, P.; R.F. Anderson y M.C. Cadmus. 1961. "Production of polysaccharide with *Xanthomonas campestris*". *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.* 3, 51-63.
- Rogovin, P.; W. Albrecht y V. Sohns. 1965. "Production of industrial grade polysaccharide B-1459". *Biotech. Bioeng.* 7, 161-169.
- Roman, R.; M. Gavrilescu; A. Sauciuc; A. Pintilie y A. Pascal. 1993. "Transferul de masa al oxigenului in bioreactoare cu agitare mecanica" *Revista de Chimie.* 44, 7, 664-667.

Santos, V.E. 1993. "Producción de xantano ". *Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.*

Seo, J.H. y J.E. Bailey. 1987. "Cell cycle analysis of plasmid containing *Escherichia coli* HB101 populations with flow cytometry". *Biotech. Bioeng.* **30**, 297-305

Schlosser, P.M.; Holcom, T.; Bailey, J.E. 1993. "Determining metabolic sensitivity coefficients directly from experimental data". *Biotech. Bioeng.* **41**, 1027-1038.

Schweickart, R.W y A.V. Quinlan. 1989. "Kinetics of xanthan production when NH₃-N limits biomass synthesis and glucose limits polysaccharide synthesis". *J. Biomech. Eng.* **111**, 166-171.

Shu, Ch-H. y Sh-T. Yang. 1990. "Effects of temperature on cell growth and xanthan production in batch cultures of *Xanthomonas campestris*". *Biotech. Bioeng.* **35**, 454-468.

Shu, Ch-H. y Sh-T. Yang. 1991. "Kinetics and modelling of temperature effects on batch xanthan gum fermentations". *Biotech. Bioeng.* **37**, 567-574.

Shuler, M.L. 1985. "Invited review on the used of chemically structures models for bioreactors". *Chem. Engng. Commun.* **36**, 161-189.

Shuler, M.L; S. Leung y C.C. Dick. 1979. "A mathematical model for the growth of a single bacterial cell". *Ann. New York Acad. Sci.* **326**, 35-42.

Silman, R.W. y P. Rogovin. 1970. "Continuous fermentation to produce xanthan biopolymer: laboratory investigation". *Biotech. Bioeng.* **12**, 75-83.

Silman, R.W. y P. Rogovin. 1972. "Continuous fermentation to produce xanthan biopolymer: effect of dilution rate". *Biotech. Bioeng.* **14**, 23-31.

Sinclair, C.G. 1987. "Microbial process kinetics". en "*Basic Bitechology*". Eds: J. Bu'lock y B. Kristiansen. Academic Press. Londres. Cap: **4**: 100-103.

Skarstad, K.; H.B. Steen y E. Boye. 1983. "Cell cycle parameters of slowly growing *E. Coli* studied by flow cytometry". *J. Bacteriol.* **154**, 656-659 .

Slodki, M.E. y M.C. Cadmus. 1978. "Production of microbial polysaccharides". *Adv. Appl. Microbiol.* **23**, 19-49.

Smith, I.H. 1983. (Kelco Co.) European Patent. 68706A.

Steinmeyer, D.E. y M.L. Shuler. 1989. " Structured model for *Saccharomyces cerevisiae*". *Chem. Eng. Sci.* **44**, 2017-1030.

Souw, P. y A.L. Demain. 1979. "Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459". *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 1186-1192.

- Souw, P. y A.L. Demain, 1980. "Role of citrate in xanthan production by *Xanthomonas campestris*". *J. Ferment. Technol.* 58, 411-416.
- Suh, I-S.; A. Schumpe y W-D. Deckwer. 1992. "Xanthan production in bubble column and air-lift reactors". *Biotech. Bioeng.* 39, 85-94.
- Stephanopoulos, G. y K. San.. 1984. "Studies on on-Line bioreactor identification: I theory". *Biotech. Bioeng.* 26, 1176-1188.
- Stephanopoulos, G.; J. Vallino, 1991. "Network rigidity and methabolic engineering in methabolic overproduction". *Science* 252, 1675-1681.
- Steen, H.B. y E. Boye. 1980. "Bacterial growth studied by flow cytometry". *Cytometry* 1, 32-36.
- Steen, H.B.; E. Boye; K. Skarstad; B. Bloom; T. Godal y S. Mustafa. 1982. "Applications of flow cytometry on bacteria: cell cycle kinetics, drug effects and quantitation of antibody binding". *Cytometry*. 2, 249-256.
- Stockall, A.M. y C. Edwards. 1985. "Changes in respiratory activity during encysment of *Azotobacter vinelandii*". *J. Gen. Microbiol.* 131, 1403-1405.
- Sundaram, K.M. y G.F. Froment. 1977. "Modelling of Termal cracking kinetics -I. Thermal cracking of ethane, propane and their mixtures". *Chem. Eng. Sci.* 32, 601-608.
- Sundaram, K.M. y G.F. Froment. 1978. "Modelling of termal cracking kinetics -III. Radical mechanism of the pyrolysis of simple paraffins, olefins, and their mixtures". *Ind. Eng. Chem. Fundam.* 17, 174-182.
- Sutherland, I.W. 1975. "Lipids in the synthesis of lipopolysaccharides and exopolysaccharides". *Biochem. Soc. Trans.* 3, 840-843.
- Sutherland, I.W. 1977. "Microbial exopolysaccharide synthesis". *A.C.S. Symp. Ser.* 45, 40-57.
- Sutherland, I.W. 1983. "Biotechnology: A comprehensive treatise in 8 volumes". Eds: H.J. Rehm y G. Reed. Verlag. Chemie. Ed: H. Dellwey. 3, 533-539
- Sutherland, I.W. 1986. "Industrially useful microbial polysaccharydes". *Microbiol. Sci.* 3, 5-9.
- Tait, M.I.; I.W. Sutherland y A.J. Clarke-Sturman. 1986. "Effect of growth conditions on the production, composition and viscosity of *Xanthomonas campestris* exopolysaccharide". *J. Gen. Microbiol.* 132, 1483-1492.
- Tako, M. y W. Nakamura. 1984. "Reological properties of deacetyled xanthan in aqueous media". *Agric. Biol. Chem.* 48, 2987-2993.
- Thonart, Ph.; M. Paquot; L. Hermans; H. Alaoui y P. d'Ippolito. 1985. "Xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 and interfacial approach by zeta potential measurement". *Enz. Microb. Technol.* 7, 235-238.

Tiessier, G. 1942. *Rev. Sci. Extrait.* **3208**, 209. (citado por Moraine y Rogovin, 1971; Esener y col., 1983).

Towle, I.R. 1977. US Patent, 4,051,317

Trilsbach, G.F.; P. Pielken; K. Hamacher y H. Sahm. 1984. "Xanthan formation by *Xanthomonas campestris* under different culture conditions". *Europ. Congr. Biotech.* 3rd. Verlag Chemie. Weinheim. F.R.G. **65-70**.

Tsuchiya, H.M.; A.G. Fredrickson y R. Aris. 1966. "Dynamics of microbial cells populations". *Adv. Chem. Eng.* **6**, 125-206.

Vallino, J.J. y G. Stephanopoulos. 1993. "Metabolic flux distributions in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction". *Biotech. Bioeng.* **41**, 633-646.

Van Dedem, G. y M. Moo-Young. 1973. "Cell growth and enzyme synthesis in fermentation". *Biotech. Bioeng.* **15**, 419-439.

Van der Meijden, R.T.M.; Heijnen, J.J.; Mellinga, C.; Romein, B.; Luyben, K.Ch.A.M. 1994. "Linear constraint relation in biochemical reaction system: I classification of the calculability and the balanceability of conversion rates". *Biotech. Bioeng.* **43**, 3-10.

Van Dilla, M.A.; R.G., Langlois; D. Pinkel; D. Yajko y W.K. Hadley. 1983. "Bacterial characterization by flow cytometry". *Science* **220**, 620-621.

Vanrolleghem, P.A.; P. Jong-Gubbels; W.K. Van Guuk; J.T. Pronk; J.P. Van Dijken y S. Heijnen. 1996. "Validation of a metabolic network for *Saccharomyces cerevisiae* using mixed substrate studies". *Biotech. Prog.* **12**, 434-448.

Varma, A.; B.W. Boesch y B.O. Palsson. 1993. "Stoichiometric interpretation of *Escherichia coli* glucose catabolism under various oxygenation rates". *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2465-2473.

Varma, A. y B.O. Palsson. 1994a. "Metabolic flux balancing: basic concepts, scientific and practical use". *Bio/Technol.* **12**, 994-998.

Varma, A. y B.O. Palsson. 1994b. "Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by product secretion in wild-type *Escherichia coli* W3110". *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3724-3731.

Varma, A. y B.O. Palsson. 1995. "Parametric sensitivity of stoichiometric flux balance models applied to wild type *Escherichia coli* metabolism". *Biotech. Bioeng.* **45**, 69-79.

Vashitz, O. y M. Sheintuch. 1991. "Analysis of polymer synthesis rates during steady-state growth of *Xanthomonas campestris*". *Biotech. Bioeng.* **37**, 383-385.

Vlaev, S.D. y M. Valeva. 1990. "Rheology and oxygen transfer in starch suspensions during high temperature (35°C) α -Amylase fermentation". *The Chem. Eng. J.* **44**, B51-B55.

- Verhoff, F.H.; K. Sundaresan y M.W. Tenney. 1972.** "A mechanism of microbial cell growth". *Biotech. Bioeng.* **14**, 411-436.
- Viniegra-González, G.; G. Saucedo-Castañeda, F.López-Isunza y E.Favela-Torres. 1993.** "Symetric branching model for the kinetics of micelial growth". *Biotech. Bioeng.* **42**, 1-10.
- Wang, N.S. y G. Stephanopoulos. 1983.** "Application of macroscopic balances to the identification of gross measurement errors". *Biotech. Bioeng.* **25**, 2177-2208.
- Weiss, R.M. y D.F. Ollis. 1980.** "Extracellular microbial polysaccharides.I. Substrate, biomass and product kinetic equations for batch xanthan gum fermentation". *Biotech. Bioeng.* **22**, 859-873.
- Wellington, S.L. 1976.** (Shell Oil Co.) U.S. Patent. 4119491.
- Wellington, S.L. 1981.** "Xanthan gum molecular size distribution and configuration". *A.C.S. Polym. Prepr.* **22**, 63-66.
- Westerhoff, H.V.; Kell, A.B. 1989.** "Matrix method for determining steps most rate-limiting to metabolic fluxes in biotechnological processes" **30**, 101-107.
- Whitfield, C.; I.W. Sutherland; R.E. Cripps. 1982.** "Glucose metabolism in *Xanthomonas campestris*". *J. Gen. Microbiol.* **128**, 981-985.
- Williams, F.M. 1967.** "A model of cell growth dynamics". *J. Theor. Biol.* **15**, 190-207.
- Yagi, H. y F. Yoshida. 1975.** "Gas absorption by newtonian and non-newtonian fluids in sparged agitated vessels". *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.* **14**, 488-493.
- Yang, X.M.;Z.X. Mao; S.Z. Yang y W.Y. Mao. 1988.** "An improved method for determination of volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation processes". *Biotech. Bioeng.* **31**, 1006-1009.
- Yang, J.D. Y N.S. Wang. 1992.** "Oxygen mass transfer enhancement via fermentor headspace pressurization". *Biotech. Prog.* **8**, 244-251.
- Yasukawa, M.; M. Onodera; K. Yamagiwa y A. Ohkawa. 1991a.** "Gas holup, power consumption, and oxygen absorption coefficient in a stirred-tank fermentor under foam control". *Biotech. Bioeng.* **38**, 629-636.
- Yasukawa, M.; M. Onodera; K. Yamagiwa y A. Ohkawa. 1991b.** "Performance characteristics of an aerated agitated vessel under mechanical foam control". *Chem. Eng. J.* **24**, 188-193.
- Yoshida, F.; A. Ikeda; S. Imakawa y Y. Miura. 1960.** "Oxygen absorption rates in stirred Gas-Liquid contactors". *Ind. Eng. Chem.* **52**, 435-438.

Zaidi, A.; P. Ghosh; A. Schumpe y D-W. Deckwer. **1991**. "Xanthan production in a plugging Jet Reactor". *Appl. Microbiol Biotech.* **35**, 330-333.

Zhou, W.; K. Holzhauer-Rieger; M. Dors y K. Schügerl. **1992**. "Influence of dissolved oxygen concentration onn the biosynthesis of cephalosporin C". *Enz. Microb. Technol.* **14**, 848-854.

Zupke, C. y G. Stephanopoulos. **1994**. " Modeling of isotope distributions and intracellular fluxes in metabolic networks using atom mapping matrices". *Biotech. Prog.* **10**, 489-498.

